



DRAAIBOEK BIOMONITORING **meting van referentiewaarden in drie leeftijdsgroepen**

STEUNPUNT Milieu & Gezondheid 2007-2011

Coördinator biomonitoring:

Prof. dr. Greet Schoeters
Expertisecentrum Milieutoxicologie
Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO)
Boeretang 200
2400 Mol
Tel. 014/33.52.00.

Onderzoeksleider:

Dr. Vera Nelen
Provinciaal Instituut voor Hygiëne
Kronenburgstraat 45
2000 Antwerpen
Tel. 03/259.12.60.

INHOUDSTABEL

SAMENVATTING	4
1. Inleiding	8
2. Selectie en sampling	9
3. Pasgeborene - moeder koppels	11
3.1. Selectie materniteiten	11
3.2. Selectie moeders/pasgeborenen	11
3.3. Contact met materniteiten	11
3.4. Potentiële deelnemers	12
3.5. Toxicologische en biologische metingen	12
3.5.1. Afname en initiële verwerking van navelstrengbloed	12
3.5.2. Afname en initiële verwerking van bloed bij de moeder	13
3.5.3. Afname van haarstaal	13
3.5.4. Vervoer en selectie van stalen	13
3.5.5. Analyses	14
3.5.6. Biobank	15
3.5.7. Metingen in mengstalen	16
3.6. Algemene vragenlijsten	17
3.7. Verzamelen van data uit bestaande databanken	17
3.8. Neurologische opvolgstudie	17
3.9. Kwaliteitsbewaking	19
3.10. Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring	20
3.10.1. Initiële gegevensverwerking	20
3.10.2. Statistisch analyseplan	20
4. Adolescenten	22
4.1. Selectie scholen	22
4.2. Selectie jongeren	22
4.3. Contact met scholen	23
4.4. Potentiële deelnemers	23
4.5. Procedure voor veldwerk	24
4.5.1. Coördinatie veldwerk	24
4.5.2. Afname en initiële verwerking van urine	24
4.5.3. Afname en initiële verwerking van bloed	24
4.5.4. Afname van haarstaal	25
4.5.5. Neurologische testen	25
4.5.6. Verwerking van stalen en analyses	25
4.5.7. Biobank	27
4.6. Vragenlijsten	29
4.7. Verzamelen van data uit bestaande databanken	29
4.8. Kwaliteitsbewaking	30
4.9. Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring	31
4.9.1. Initiële gegevensverwerking	31

4.9.2.	Statistisch analyseplan	31
5.	Volwassenen	33
5.1.	Doelpopulatie	33
5.2.	Selectie deelnemers	33
5.3.	Contact met provinciebestuur	34
5.4.	Potentiële deelnemers	34
5.5.	Procedure voor veldwerk	34
5.5.1.	Coördinatie veldwerk	34
5.5.2.	Meting van acute blootstelling aan fijn stof	35
5.5.3.	Afname en initiële verwerking van urine	35
5.5.4.	Afname en initiële verwerking van bloed	35
5.5.5.	Verwerking van stalen en analyses	35
5.5.6.	Biobank	37
5.5.7.	Metingen in mengstalen	38
5.6.	Vragenlijsten	40
5.7.	Kwaliteitsbewaking	40
5.8.	Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring	41
5.8.1.	Initiële gegevensverwerking	41
5.8.2.	Statistisch analyseplan	41
6.	Communicatieplan veldwerk	43
6.1.	Externe communicatie van de resultaten in twee fasen	43
6.2.	Spelregels	44
6.3.	De Biomonitor en de Nieuwsflits	44
6.4.	Fasenplan	44

SAMENVATTING

a) Inleiding

Eén van de doelstellingen van het Steunpunt Milieu en Gezondheid, campagne 2007-2011, is het opzetten van een surveillance systeem voor **biomonitoring**.

In de huidige studie willen we **referentiewaarden** bepalen voor biomerkers van blootstelling en biomerkers van effect in de algemene bevolking van Vlaanderen.

Biomerkers van blootstelling geven een beeld van de interne blootstelling aan polluenten. Er worden 'historische polluenten' gemeten zoals zware metalen, PCBs, dioxine-achtige stoffen, gechloreerde pesticiden. Daarnaast worden voor het eerst ook 'nieuwe polluenten' gemeten op grote schaal, o.a. gebromeerde vlamvertragers, bisphenol A, ftalaten, metabolieten van nieuwe pesticiden, parabenen, musks.

Deze referentiewaarden hebben tot doel om:

- tijdstrends in blootstelling op te volgen binnen Vlaanderen;
- blootstelling in Vlaanderen te vergelijken met andere landen;
- te dienen als controlewaarde voor later uit te voeren 'case studies'.

Biomerkers van effect geven een beeld van de biologische effecten die mogelijk het gevolg zijn van blootstelling aan polluenten. In deze studie worden immunologische, endocriene, genotoxische en neurologische effecten gemeten.

b) Deelnemers

In totaal dienen 650 stalen genomen te worden, verdeeld over de volgende **drie** leeftijdsgroepen:

1. Pasgeborene - moeder koppels: 250
2. Jongeren (14-15 jaar): 200
3. Jong volwassen mannen en vrouwen (20-40 jaar): 200

Aangezien we referentiewaarden willen bepalen voor de bevolking van Vlaanderen, kan iedereen die in Vlaanderen woont deelnemen aan de studie, op voorwaarde dat hij/zij binnen de geselecteerde leeftijdsklasse valt, en minimum 10 jaar in Vlaanderen woont.

Selectie van de deelnemers gebeurt via een multistage sampling plan.

- De 1^{ste} stap is een stratificatie volgens de provincie.
- In de 2^{de} stap wordt de primaire sampling units (PSU) geselecteerd worden: materniteiten in geval van pasgeborenen; scholen in geval van adolescenten; het provinciebestuur bij de volwassenen.
- In de 3^{de} stap worden binnen elke PSU de secundaire sampling units (SSU) - de deelnemers in de juiste leeftijdsklasse - geselecteerd.

		Pasgeborene-moeder	Adolescenten / volwassenen
	populatie op 01.06.07 - % tov Vlaamse gewest	Aantal deelnemers	Aantal deelnemers
Antwerpen	28	70	56
Vlaams-Brabant	17	42	34
Limburg	13	32	26
Oost-Vlaanderen	23	58	46
West-Vlaanderen	19	48	38
Totaal	100	250	200

De selectiecriteria zijn de volgende:

Pasgeborene - moeder koppels

Voor de selectie van pasgeborene-moeder koppels wordt er gewerkt via materniteiten.

Voorwaarden voor inclusie deelnemende moeders voor analyse van navelstrengbloed:

- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen;
- Toestemming geven (informed consent): dit betekent bereid zijn om navelstrengbloed, bloed van de moeder, haar van de moeder te geven, een uitgebreide vragenlijst in te vullen in de week na de bevalling en gedurende 2 jaar korte vragenlijsten in te vullen over de neurologische opvolging van het kind.
- Nederlandstalige vragenlijst kunnen invullen (met vragen over de zwangerschap/ gezondheid/ sociale parameters/ woonomgeving/ levensstijl/ roken/ alcohol/ voeding en perceptie over milieu en gezondheid)

Adolescenten

Voor de selectie van 14-15-jarige jongeren wordt er gewerkt via secundaire scholen.

Voorwaarden voor inclusie deelnemende jongeren:

- Geboren zijn in 1992/93 (schooljaar 2007-08) of 1993/94 (schooljaar 2008-09)
- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen
- Toestemming van de ouders én de jongere (informed consent), d.w.z. bereid zijn om een bloedstaal, urinestaal en haarstaal te leveren, een uitgebreide vragenlijst in te vullen en een computertest uit te voeren.
- Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen.
- Les volgen in het derde jaar secundair onderwijs

Volwassenen

Het steekproefkader is een lijst van de werknemers van de verschillende Vlaamse provincies die in de juiste leeftijdscategorie vallen.

Voorwaarden voor inclusie deelnemers:

- Geboortedatum tussen 1/1/1968 en 31/12/1988;
- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen;
- Toestemming gegeven hebben (informed consent), d.w.z. bereid zijn om bloed en urine te leveren en een uitgebreide vragenlijst in te vullen.
- Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen;

c) Overzicht van uit te voeren metingen

Deelstudie	I	II	III
Deelnemers	Pasgeborenen / moeders	Adolescenten (14-15 jaar)	Volwassenen (20-40 jaar)
Aantal	250	200	200
Studieperiode	mei '08 - april '09	mei '08 - april '09	mei '08 - april '09
Recrutering via	Materniteiten	Scholen	Provinciebestuur
Metingen in	navelstrengbloed perifeer bloed moeder haar moeder	perifeer bloed urine haar	perifeer bloed urine
Blootstellings- merkers in individuele stalen	<i>Navelstrengbloed:</i> zware metalen, gechloroerde persistente polluenten, gebromeerde persistente polluenten, bisphenol A, perfluoro-derivaten, musk derivaten <i>Bloed van de moeder:</i> zware metalen <i>Haar van de moeder:</i> zware metalen	<i>Bloed:</i> zware metalen, gechloroerde persistente polluenten, gebromeerde persistente polluenten, bisphenol A, musk derivaten <i>Urine:</i> zware metalen, metaboliëten van PAKs, benzeen, ftalaten, pesticiden, parabenen <i>Haar:</i> zware metalen	<i>Bloed:</i> perfluoro-derivaten, <i>Urine:</i> zware metalen, metaboliëten van PAKs, benzeen, ftalaten, pesticiden, parabenen
Effectmerkers	<u>Pasgeborene</u> <i>Groei en ontwikkeling:</i> zwangerschapsduur, lengte, gewicht, schedelomtrek, schildklierhormonen, metabole hormonen, sex hormonen <i>Neurologie:</i> opvolging tot 2 jaar (vragenlijst) <u>Moeder</u> <i>Fertiliteit:</i> vruchtbaarheidsbehandeling, tijd tot zwangerschap, miskraam (vragenlijst) <i>Immunologie:</i> astma en allergie (vragenlijst)	<u>Adolescent</u> <i>Groei:</i> lengte, gewicht, schildklierhormonen <i>Sexuele ontwikkeling:</i> hormoonspiegels, puberteitsstadia (CLB) <i>Immunologie:</i> astma en allergie (vragenlijst) <i>Genotoxiciteit:</i> komeetttest, 8-OH-deoxyguanosine <i>Genexpressie</i> <i>Neurologie:</i> score voor ADHD, NES testen	<u>Volwassene</u> <i>Cardiovasculaire merkers:</i> bloedplaatjesaggregatie, Hsp60, ICAM, geoxideerd LDL <i>Fertiliteit:</i> vruchtbaarheidsbehandeling, tijd tot zwangerschap, miskraam (vragenlijst), inhibine B bij man <i>Immunologie:</i> astma en allergie (vragenlijst) <i>Genotoxiciteit:</i> 8-OH-deoxyguanosine

Deelstudie	I	II	III
Invoeds- factoren (confounders)	<i>Vragenlijst:</i> levensstijl, beroep, voeding, woonomgeving <i>Biochemie:</i> cholesterol, ferritine in navelstreng- bloed	<i>Vragenlijst:</i> levensstijl, hobby's, voeding, woonomgeving <i>Biochemie:</i> cholesterol, ferritine in bloed; creatinine in urine, cotinine in urine	<i>Vragenlijst:</i> levensstijl, beroep, voeding, woonomgeving <i>Biochemie:</i> cholesterol, HCL, bloedplaatjes, hematocriet, ferritine in bloed; creatinine in urine, cotinine in urine
Metingen van blootstellings- merkers in gepoolde stalen	<i>Navelstrengbloed:</i> parabenen, UV screens	<i>Bloed:</i> parabenen, UV screens <i>Urine:</i> metaboliëten van PAKs, pyrethroïde pesticiden, chlorofenoxy- pesticiden, carbamaat- pesticiden, fungiciden	<i>Urine:</i> metaboliëten van PAKs, pyrethroïde pesticiden, chlorofenoxypesticiden, carbamaatpesticiden, fungiciden
Biobank	navelstrengbloed bloed moeder haar moeder (100 mg) gepoolde stalen in groep van bijkomende deelnemers (ander consent)	(bloed) urine haar	bloed urine gepoolde stalen in deelnemers die vrijwillig extra bloed geven

d) Communicatie

In de eerste fase wordt de individuele uitslag van de metingen persoonlijk meegedeeld aan de deelnemers. Zij moeten op voorhand aangeven of ze de resultaten thuis willen ontvangen, of ze helemaal niet willen ontvangen. Niet interpreteerbare resultaten worden enkel op vraag van de deelnemers gecommuniceerd, steeds vergezeld van toelichting. Resultaten worden onmiddellijk meegedeeld indien ze van medisch belang zijn voor de betrokkene. Resultaten van bijkomende analyses worden enkel op vraag van de deelnemers meegedeeld.

Na statistische verwerking worden in een tweede fase de collectieve meetresultaten voor heel Vlaanderen gecommuniceerd. De deelnemers aan het onderzoek krijgen de voornaamste collectieve resultaten persoonlijk toegestuurd. Daarna worden de resultaten (elektronisch) gecommuniceerd naar een aantal intermediaire groepen, zoals provinciebesturen, lokale huisartsenkringen, moederhuizen en scholen. Tenslotte is er de communicatie naar het grote publiek via een persconferentie.

DRAAIBOEK BIOMONITORING

meting van referentiewaarden in drie leeftijdsgroepen

1. Inleiding

Eén van de doelstellingen van het Steunpunt Milieu en Gezondheid, campagne 2007-2011, is het opzetten van een surveillance systeem voor **biomonitoring**.

In de huidige studie willen we **referentiewaarden** bepalen voor biomerkers van blootstelling en biomerkers van effect in de algemene bevolking van Vlaanderen.

Biomerkers van blootstelling geven een beeld van de interne blootstelling aan polluenten. Er worden 'historische polluenten' gemeten zoals zware metalen, PCBs, dioxine-achtige stoffen, gechloreerde pesticiden. Daarnaast worden voor het eerst ook 'nieuwe polluenten' gemeten op grote schaal, o.a. gebromeerde vlamvertragers, bisphenol A, ftalaten, metabolieten van nieuwe pesticiden, parabenen, musks.

Deze referentiewaarden hebben tot doel om:

- tijdstrends in blootstelling op te volgen binnen Vlaanderen: de huidige referentiewaarden worden vergeleken met waarden uit vroegere biomonitoringscampagnes in Vlaanderen, namelijk met de biomonitoring in de pilotstudie Milieu & Gezondheid (1999) en in het 1^e Steunpunt Milieu & Gezondheid (2001-2006);
- blootstelling in Vlaanderen te vergelijken met andere landen.
- te dienen als controlewaarde voor later uit te voeren 'case studies'. In een latere fase zal binnen het Steunpunt M&G een aantal studies worden uitgevoerd in regio's of bevolkingsgroepen met een specifieke milieubelasting of met milieu-gerelateerde gezondheidsproblemen, nl. 'case studies'. De referentiewaarden die in de huidige studie gegenereerd zullen worden, kunnen dienen als controlewaarde voor de case studies.

Biomerkers van effect geven een beeld van de biologische effecten die mogelijk het gevolg zijn van blootstelling aan polluenten. In deze studie worden immunologische, endocriene, genotoxische en neurologische effecten gemeten.

2. Selectie en sampling

In totaal dienen 650 stalen genomen te worden, als volgt verdeeld over de volgende **drie** leeftijdsgroepen:

4. Pasgeborene - moeder koppels: 250
5. Jongeren (14-15 jaar): 200
6. Jong volwassen mannen en vrouwen (20-40 jaar) : 200

Aangezien we referentiewaarden willen bepalen voor de bevolking van Vlaanderen, kan iedereen die in Vlaanderen woont deelnemen aan de studie, op voorwaarde dat hij/zij binnen de geselecteerde leeftijdsklasse valt, en minimum 10 jaar in Vlaanderen woont.

Omwille van de praktische haalbaarheid van het veldwerk en ervaringen uit het vorige steunpunt wordt geopteerd om weer te werken via een **multistage sampling plan**. Deze procedure omvat 3 stappen.

De **1^{ste} stap** is een stratificatie volgens de *provincie*. Deze stratificatie naar provincie garandeert dat elke provincie vertegenwoordigd is bij het bepalen van de referentiewaarden. Het aantal stalen per provincie per leeftijdsgroep is evenredig met het aantal inwoners in de provincie op 01.06.2007. Dit betekent dat kleine provincies minder stalen leveren dan grote provincies. Voor de berekening van de gemiddelde waarde voor Vlaanderen betekent dit dat er geen herweging nodig is van de resultaten. Voor sommige provincies zal het aantal stalen zo laag zijn dat een verwerking per provincie totaal zinloos is. Maar dit is ook niet de doelstelling van het bepalen van de referentiewaarden.

Tabel 1: Aantal deelnemers per campagne

	populatie op 01.06.07 - % tov Vlaamse gewest	Pasgeborene-Moeder	Adolescenten / volwassenen
		Aantal deelnemers	Aantal deelnemers
Antwerpen	28	70	56
Vlaams-Brabant	17	42	34
Limburg	13	32	26
Oost-Vlaanderen	23	58	46
West-Vlaanderen	19	48	38
Totaal	100	250	200

Omwille van praktische haalbaarheid moet de sampling in **groepen/clusters** gebeuren. Het is onmogelijk om het veldwerk te organiseren als er willekeurig 650 personen geselecteerd worden uit het rijksregister. Dit resulteert in 650 adressen waar een staal genomen moet worden. Dit is niet uitvoerbaar. Vandaar dat in de **2^{de} stap** van deze procedure de primaire sampling units (PSU) geselecteerd worden. Voor de pasgeborene-moeder koppels en voor de jongeren is het duidelijk dat de PSU de materniteiten respectievelijk de scholen zijn. Voor de selectie van volwassen mannen en vrouwen werd geopteerd om via de provinciebesturen te werken (zie paragraaf 5).

Het PIH kan het veldwerk maar organiseren indien er per provincie maximaal twee PSU's geselecteerd worden waar staalname zal gebeuren. Per PSU worden er meerdere stalen verzameld, eventueel op meerdere (staalname) momenten (bijvoorbeeld voorjaar en najaar). De stalen die op een bepaald moment binnen eenzelfde PSU gecollecteerd worden noemen we een cluster. Uiteraard zijn de stalen in een cluster/groep niet onafhankelijk van elkaar. Dit geeft een klein verlies van precisie. Om de spreiding zo optimaal mogelijk te maken zal een cluster ook niet meer dan 20 stalen bevatten.

Per provincie worden alle PSU opgelijst. Per provincie wordt de eerste PSU geselecteerd; waarbij de kans op selectie evenredig is met de grootte van de PSU. Voor de materniteit is de grootte het aantal bevallingen het afgelopen jaar. Voor de scholen is de grootte het aantal leerlingen in het derde leerjaar.

Voor de selectie van de tweede PSU worden volgende restricties meegenomen:

- Deze PSU mag niet in dezelfde stad liggen als de eerste PSU.
- Deze PSU mag niet op minder dan 20 km van de eerste PSU liggen.

Door deze voorwaarde in de selectieprocedure op te nemen voorkomen we dat we twee keer in het zelfde 'gebied' rekruteren.

In de 3^{de} stap van de procedure worden binnen elke PSU de secundaire sampling units (SSU) geselecteerd. Alle SSU van een PSU komen in aanmerking voor selectie. De deelnemer (moeder, adolescent of volwassene) mag aan de studie deelnemen indien hij/zij minimaal 10 jaar in Vlaanderen woont, bereid is mee te werken (informed consent) en in staat is de Nederlandstalige vragenlijst in te vullen. Zoals reeds aangehaald worden deze SSU in clusters bemonsterd.

Per leeftijdsgroep¹ worden er 2 PSU geselecteerd (met telkens een reserve PSU voor het geval de PSU niet wil deelnemen). Vervolgens wordt per PSU het aantal clusters bepaald.

Tabel 2: Aantal deelnemers per groep in verschillende campagnes

	Pasgeborene-Moeder	Adolescenten
	groepen	groepen
Antwerpen	20+20+15+15	20+18+18
Vlaams-Brabant	15+15+12	17+17
Limburg	16+16	13+13
Oost-Vlaanderen	20+19+19	15+15+16
West-Vlaanderen	15+15+18	19+19
Totaal	250	200

Deze groepen/clusters worden vervolgens, per provincie, verdeeld over de seizoenen. Het is duidelijk dat de effecten van seizoen en provincie niet volledig los van elkaar bestudeerd kunnen worden. Voor de kleinere provincies zal er maar staalname zijn op twee tijdstippen (twee seizoenen). Globaal zal een gelijke verdeling over de vier seizoenen na gestreefd worden. Deze verdeling zal in zoverre als mogelijk voor de drie leeftijdsgroepen gelijk gehouden worden. Hierdoor spelen de confounding effecten van seizoen en provincie op dezelfde manier in de drie leeftijdsgroepen.

Wat betreft de verdeling landelijk/stedelijk van de deelnemers is het zeer moeilijk te voorspellen hoeveel percent van de deelnemers stedelijk of landelijk woont. Door de selectiekans van de eerste PSU evenredig te maken met de grootte van deze PSU hopen we PSU's in de studie te hebben die deelnemers uit een ruimer geografisch gebied hebben. Door er verder voor te zorgen dat de twee geselecteerde PSU niet uit dezelfde stad komen, hopen we geen oververtegenwoordiging van deelnemers uit stedelijk gebied te hebben. Bijsturen tijdens het veldwerk zelf is echter zeer moeilijk. Het opstarten van bijvoorbeeld een materniteit is zeer arbeidsintensief en kan dus niet zomaar alla minute gebeuren. Anderzijds is voor de pasgeborenen en de jongeren de woonplaats van de moeder of de adolescent op het moment van de steekproeftrekking niet bekend.

Indien er een goede indeling in stedelijk en landelijk gebied voor Vlaanderen beschikbaar is, kan deze info wel gebruikt worden om de gegevens nadien statistisch te wegen.

¹ Voor de volwassenen wordt er via het provinciebestuur gewerkt en is er geen selectie van een PSU.

3. Pasgeborene - moeder koppels

Voor de selectie van pasgeborene-moeder koppels wordt er gewerkt via materniteiten.

3.1. Selectie materniteiten

Voor de selectie van materniteiten stellen we een lijst op van alle materniteiten in Vlaanderen (info van Centrum voor Perinatale aandoeningen, SPE).

Alle materniteiten met minimaal 500 bevallingen per jaar komen in aanmerking. Indien er minder dan 500 bevallingen per jaar zijn, is het veldwerk niet op 1 week uitvoerbaar en wordt het te arbeidsintensief. Materniteiten die samenwerken met de bloedbank kunnen geen navelstrengbloed aanleveren (enkel plasma, maar dit is niet voldoende om alle metingen uit te voeren). Deze materniteiten worden vervangen.

Per provincie worden er twee materniteiten geselecteerd voor de biomonitoring. De selectie van de eerste materniteit is evenredig met de grootte, d.w.z. met het aantal bevallingen per jaar.

Vervolgens worden alle materniteiten die in dezelfde stad of binnen een straal van 20 km gelegen zijn uit de lijst verwijderd. Hierdoor voorkomt men dat alle stalen uit eenzelfde gebied zouden komen. Vervolgens wordt uit deze gereduceerde lijst een tweede materniteit geselecteerd; waarbij de kans op selectie evenredig is met het aantal bevallingen.

3.2. Selectie moeders/pasgeborenen

Voor elke geselecteerde materniteit moet een aantal pasgeborene-moeder koppels in de studie geïncludeerd worden. Indien dit er meer dan 20 zijn, wordt het aantal te behalen stalen verdeeld over twee staalname-momenten (bijv. voorjaar en najaar) (zie tabel 2).

Voor elke geselecteerde materniteit wordt de start van de sampling momenten vastgelegd (één of meerdere). Vanaf dat moment moet aan alle vrouwen die bevallen gevraagd worden of ze aan de studie wensen deel te nemen tot het voorziene aantal deelnemende moeder-pasgeborene koppels bereikt is (zie tabel 2). De vrouwen die bevallen in een bepaalde materniteit zijn meestal afkomstig van een ruimer gebied rondom de materniteit. Deze manier van werken resulteert dus niet in het rekruteren van stalen uit een kleine geografische eenheid.

Voorwaarden voor inclusie deelnemende moeders voor analyse van navelstrengbloed:

- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen;
- Toestemming geven (informed consent): dit betekent bereid zijn om navelstrengbloed, bloed van de moeder, haar van de moeder te geven, een uitgebreide vragenlijst in te vullen in de week na de bevalling en gedurende 2 jaar korte vragenlijsten in te vullen over de neurologische opvolging van het kind.
- Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen;

3.3. Contact met materniteiten

- Contact opnemen met de diensthoofden gynaecologie en/of verloskunde van de geselecteerde materniteiten. Persoonlijk bezoek door één van de medewerkers om programma uit te leggen. Vragen om medewerking.
- Naargelang de lokale gebruiken ook informeren en/of toestemming vragen van hoofdgeneesheer en voorzitter medische raad, ethische commissie van het ziekenhuis

- ❑ Briefing gynaecologen, vroedvrouwen en verpleegkundigen en afspreken van de procedures.
- ❑ Selectie van de periode waarin navelstrengbloed zal verzameld worden bij alle kinderen die geboren worden.

3.4. Potentiële deelnemers

Een geïnformeerd toestemmingsformulier met uitleg over de biomonitoring wordt voorgelegd aan de moeders. Dit gebeurt door de veldwerkers van het steunpunt of door een contactpersoon in de materniteit in de periode dat de moeder op de materniteit verblijft. In de informed consent zal kort vermeld worden welke analyses op navelstrengbloed worden uitgevoerd. Tevens vragen we de moeders om een algemene vragenlijst omtrent levensstijl/ ziekten/ beroepsblootstellingen en voeding in te vullen bij de geboorte en korte vragenlijsten over neurologische ontwikkeling gedurende de 2 eerste levensjaren van het kind (via post). Er wordt verder gewezen op het feit dat:

- ❑ Niet alle kinderen geselecteerd worden voor de studie: enkel deelname als voldaan is aan de inclusiecriteria en als het aantal deelnemers dat gerekruteerd werd nog onvoldoende is.
- ❑ Privacy zal beschermd worden: gebruik codenummers.
- ❑ Deelnemers recht hebben zich terug te trekken uit de studie.
- ❑ De reststalen van bloed en haar bewaard blijven voor eventuele toekomstige analyses (biobank).
- ❑ Deelnemers recht hebben op informatie omtrent procedures en het onderzoeksproject in zijn geheel (via de hoofdonderzoeker).
- ❑ Onderzoek naar reden van vroeggeboorte, aangeboren afwijking e.d. niet mogelijk is op basis van de studie.

Het afgenomen navelstrengbloed wordt gestockeerd tot toestemming (informed consent) wordt bekomen van de moeder. Het navelstrengbloed van moeders die weigeren om deel te nemen wordt vernietigd.

3.5. Toxicologische en biologische metingen

3.5.1. Afname en initiële verwerking van navelstrengbloed

- ❑ Het kind wordt vlak na de bevalling op de buik van de moeder gelegd.
- ❑ De navelstreng wordt vervolgens afgeklemd.
- ❑ Het navelstrengbloed in het gedeelte van de navelstreng dat nog verbonden is met de placenta wordt verzameld.
- ❑ Het bloed uit de navelstreng laten druppelen in één of twee polypropyleen tubes van 50 ml (getest op metaalcontaminatie) gevuld met Na-EDTA (pp-Corning). In normale omstandigheden kan er op deze manier minstens 50 mL bloed worden verzameld. De moeder kan dan deelnemen aan de studie. Indien er minder dan 50 mL navelstrengbloed wordt verzameld, wordt aan de moeder gevraagd of zij het navelstrengbloed wil afstaan voor het aanmaken van gepoolde stalen. In dat geval vult de moeder een ander consent en een korte vragenlijst in (zie verder: 3.5.7.).
- ❑ Afname navelstrengbloed in de geselecteerde weken. Stockage van het navelstrengbloed tot toestemming wordt bekomen.
- ❑ Tube labelen met identificatiecode

- In het ziekenhuislaboratorium wordt het bloed verwerkt en bewaard (2 mogelijke procedures, afhankelijk van het volume van het verzamelde navelstrengbloed (meer of minder dan 50 mL))

3.5.2. Afname en initiële verwerking van bloed bij de moeder

In de eerste dagen na de bevalling wordt perifeer bloed afgenomen bij de moeder. Indien mogelijk wordt dit gecombineerd met de bloedname voor de bepaling van ijzerstatus die routine-matig in de materniteit gebeurt.

- 1 tube van 10 ml in EDTA tube
- Tube wordt gelabeld en bewaard bij kamertemperatuur

3.5.3. Afname van haarstaal

In de eerste dagen na de bevalling wordt een staal van het haar afgenomen bij de moeder door een veldwerker van het steunpunt of een contactpersoon in de materniteit.

- Aanbevolen locaties zijn het onderste en bovenste deel van de nek en de zijkant van het hoofd.
- Voor het knippen wordt een schaar van roestvrij staal gebruikt.
- Enkel de 2,5 cm van het haar, het dichtst tegen de schedel wordt behouden (nieuwgroei). De rest van het haar wordt afgeknipt en weggegooid.
- Een staal kan bestaan uit kleine porties die genomen werden op verschillende locaties van de schedel. De totale hoeveelheid haar dient ongeveer een goed gevulde theelepel te bedragen (100-150 mg).
- Het haar wordt bewaard in plastic zakje dat vrij is van metalen.
- Het staal wordt gelabeld met de identificatiecode en bewaard bij kamertemperatuur.

3.5.4. Vervoer en selectie van stalen

Het PIH-Antwerpen zal de volgende taken uitvoeren:

- Uitleg geven over het onderzoek en toestemming vragen. Nakijken van de informed consent formulieren en opdelen van de vrouwen in volgende groepen:
 - (a) toestemming gegeven en ≥ 10 jaar wonen in Vlaanderen en Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen \rightarrow bloedstalen worden verder verwerkt en er wordt haarstaal genomen;
 - (b) geen toestemming gegeven of < 10 jaar wonen in Vlaanderen of geen Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen \rightarrow navelstrengbloed wordt vernietigd en deelnemer komt niet in studie.
- Nemen van een haarstaal
- De bloed- en haarstalen worden getransporteerd naar het coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen (VITO-Milieutoxicologie).
Daar staat men in voor de verdere verwerking en behandeling van de stalen:
 - (a) overbrengen van bloed- en haarstalen in de verschillende analysetubes
 - (b) stockeren van stalen
 - (c) transport van stalen naar uitvoerende laboratoria
 - (d) stockeren van reststalen voor biobank

3.5.5. Analyses

Overzicht van de analyses die zullen uitgevoerd worden:

- (a) Metingen van blootstellingsmerkers in navelstrengbloed
- **Zware metalen: 2 mL volbloed:**
 - lood, cadmium, arseen, nikkel, cobalt, chroom
 - **Gechloroerde en gebromeerde persistente polluenten: 4 mL plasma:**
 - merker PCBs
 - gechloroerde pesticiden: HCB en p,p'-DDE
 - polygebromeerde diphenylethers (merker PBDEs)
 - hexabromocyclododecaan (HBCD)
 - **Bisphenol A: 1,5 mL plasma:**
 - tetrabromobisphenol A (TBBPA)
 - bisphenol A (BPA)
 - **Perfluoroderivaten: 2,5 mL plasma:**
 - PFOA, PFNA
 - **Dioxine-achtige stoffen: 3,75 mL plasma:**
 - Calux assay
 - **Musk derivaten: 5 mL bloed:**
 - musk xyleen, galaxolide, tonalide, musk keton
- (b) Metingen van effectmerkers en merkers van individuele gevoeligheid in navelstrengbloed
- **Hormonen en metabolieten: 3,5 mL plasma:**
 - schildklierhormonen: TSH, fT3, fT4
 - sex hormonen: testosteron, oestradiol, LH, FSH, SHBG
 - insuline, insulin-like growth factor 1, leptine, glucose
 - cholesterol, triglyceriden
- (c) Metingen in perifere bloed van de moeder
- **Cadmium: 2 mL volbloed:**
 - cadmium
- (d) Metingen in haar van de moeder
- **Zware metalen: 100-150 mg haar:**
 - kwik en methylkwik

Tabel 3: Overzicht van benodigde hoeveelheid staal bij pasgeborenen-moeder koppels voor uitvoeren van geplande metingen

Matrix	Hoeveelheid
Navelstrengbloed	- 7 mL volbloed - 15,25 mL plasma = 30,5 mL bloed Totaal: 37,5 mL navelstrengbloed
Perifere bloed van de moeder	2 mL volbloed
Haar van de moeder	100-150 mg haar

3.5.6. Biobank

Binnen het huidige biomonitoringsproject wordt gestart met de opbouw van een biobank. Het doel is om reststalen en extra stalen te bewaren zodat eventueel later te plannen analyses nog kunnen worden uitgevoerd.

Bij de aanleg van de biobank wordt rekening gehouden met volgende aspecten:

- **Wettelijke en ethische aspecten:**
 - Het principe van biobank wordt uitgelegd in het toestemmingsformulier van de deelnemer.
 - Alle stalen worden vernietigd indien de deelnemer uit de studie stapt; reeds uitgevoerde metingen blijven behouden in de databank.
 - Enkel onderzoekers die behoren tot het onderzoeksconsortium kunnen voorstellen doen voor nieuwe metingen.
 - Voor iedere nieuwe meting wordt een aanvraag ingediend bij de ethische commissie.
 - Het beheer van de biobank tijdens het huidige Steunpunt Milieu & Gezondheid (2007-2011) valt onder verantwoordelijkheid van het Dagelijks Bestuur, met toezicht van de Stuurgroep. Bij het einde van het onderzoeksprogramma wordt beslist wie de biobank verder zal beheren. Dit gebeurt in overleg tussen de opdrachtgever (Vlaamse overheid) en het onderzoeksconsortium.
 - Deelnemers worden bij het eind van de studie (eind 2011) geïnformeerd over de metingen die werden uitgevoerd, en de verdere planning voor het beheer van de biobank. Er wordt een contactadres voorzien waar deelnemers terecht kunnen voor informatie over de biobank.

- **Beheer en kwaliteitsgaranties van de biobank:**
 - De biobank wordt beheerd door Vito.
 - Voor ieder staal worden de optimale bewaarconditie voorzien, nl. aangepaste temperatuur (4°C, -20°C, -80°C, N₂), optimaal recipiënt en volume. Er wordt een uniforme manier van labellen gebruikt.
 - Er wordt een beveiligingssysteem voorzien voor temperatuursgaranties (alarmsysteem, CO₂-back-up, reservecapaciteit voor diepvriezers). Er wordt een logboek bijgehouden met o.a. temperatuursregistratie, accidentele verhoging.
 - Er worden op regelmatige tijdstippen herhaalde metingen uitgevoerd van een aantal geselecteerde routinemetingen om de kwaliteit van de stalen op te volgen.
 - Voor de registratie en het beheer van de stalen wordt een aparte database voorzien, die onder toezicht staat van een datamanager. Het beheerssysteem moet toelaten om de historiek en de plaats van ieder staal snel en efficiënt te traceren. De database met stalenregister staat op zich, maar kan op eenvoudige wijze worden gekoppeld aan de databank met vragenlijstgegevens en meetresultaten.

- **Praktische uitwerking van biobank bij de pasgeborenen campagne**
 - **Navelstrengbloed**
 - Bij de afname van navelstrengbloed wordt aan de vroedvrouw gevraagd om het bloed volledig te laten uitdruppelen uit de navelstreng. Uit vorige biomonitoringstudies weten we dat dit meestal resulteert in een staal van 50 mL

- Er worden momenteel metingen gepland op 37,5 mL navelstrengbloed (zie tabel 3).
 - De reststalen van bloed en plasma worden ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank.
- **Perifeer bloed van de moeder**
 - Er worden momenteel metingen gepland op 2 mL bloed van de moeder (tabel 3).
 - Er wordt een bloedname voorzien van 10 mL bloed.
 - Het reststaal van het bloed en het serum wordt ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank.
- **Haar van de moeder**
 - Er wordt een haarstaal van 100-150 mg genomen.
 - Hierop wordt één meting voorzien.
 - De rest van het haar wordt bewaard onder de juiste bewaarcondities (nog te beslissen).

Tabel 4: Overzicht van staalnames bij pasgeborenen-moeder koppels

Matrix	Totaal volume	Nodig voor analyse	Biobank
Navelstrengbloed	volledig laten uitdruppelen	37,5 mL	rest
Perifeer bloed van de moeder	10 mL	2 mL	8 mL
Haar van de moeder	100-150 mg	fractie	rest

3.5.7. Metingen in mengstalen

Sommige van bovenstaande metingen in navelstrengbloed zijn in Vlaanderen nog nooit uitgevoerd op grote schaal. De metingen zijn kostelijk, de te verwachten niveaus zijn enkel uit de literatuur gekend, en er is niet altijd ervaring in samenwerking met het uitvoerende lab.

Om de methodologie uit te testen en om een idee te hebben over de te verwachten niveaus in navelstrengbloed, zullen sommige metingen vooraf in gepoolde stalen gemeten worden. Op deze manier wordt de haalbaarheid van de meting getest.

Het gaat om volgende metingen in navelstrengbloed:

- TBBPA en BPA in bloed (1,5 mL serum per meting)
- PFOS en PFNA in bloed (2,5 mL serum per meting)
- musk derivaten (5 mL bloed per meting)

Daarnaast wordt een aantal metingen enkel uitgevoerd in de gepoolde stalen. Op deze manier krijgen we een eerste indicatie van de te verwachten niveaus in Vlaanderen. Deze metingen worden echter niet uitgevoerd op de individuele stalen omdat de methode nog experimenteel is en/of omdat we kunnen verwachten dat een aanzienlijk aandeel van de stalen onder de detectielimiet zal liggen.

Het gaat om volgende metingen in navelstrengbloed:

- parabenen in bloed (5 mL serum per meting)
- UV screens (benzophenon, camphor, cinamaten) in bloed (5 mL serum per meting)

Aan moeders waarbij het volume navelstrengbloed onvoldoende is, i.e. minder dan 50 mL na volledig uitdruppelen van de navelstreng, wordt gevraagd of zij het bloedstaal willen afstaan voor het aanmaken van gepoolde stalen. Er wordt een gepoold staal aangemaakt per provincie op basis van 5 à 10 stalen (gelijke volumes). Op deze stalen kunnen bovenstaande metingen worden uitgevoerd. Moeders tekenen een apart informed consent en vullen een beknopte vragenlijst in met een aantal basisgegevens. Er wordt benadrukt dat deze gegevens anoniem zijn, en dat er dus geen individuele resultaten kunnen worden meegedeeld.

3.6. Algemene vragenlijsten

Moeders die bevallen zijn, die toestemming gegeven hebben en bovendien voldoen aan de inclusiecriteria, vullen een vragenlijst in over de zwangerschap, gezondheid, sociale parameters, woonomgeving, levensstijl, roken, alcohol, voeding en perceptie over milieu en gezondheid.

De vragenlijst zal bij voorkeur worden ingevuld door de moeders gedurende eerste dagen na de bevalling in de materniteit.

3.7. Verzamelen van data uit bestaande databanken

Van de kinderen die in de studie worden opgenomen zullen later gegevens verzameld worden uit (bestaande) gegevensbanken:

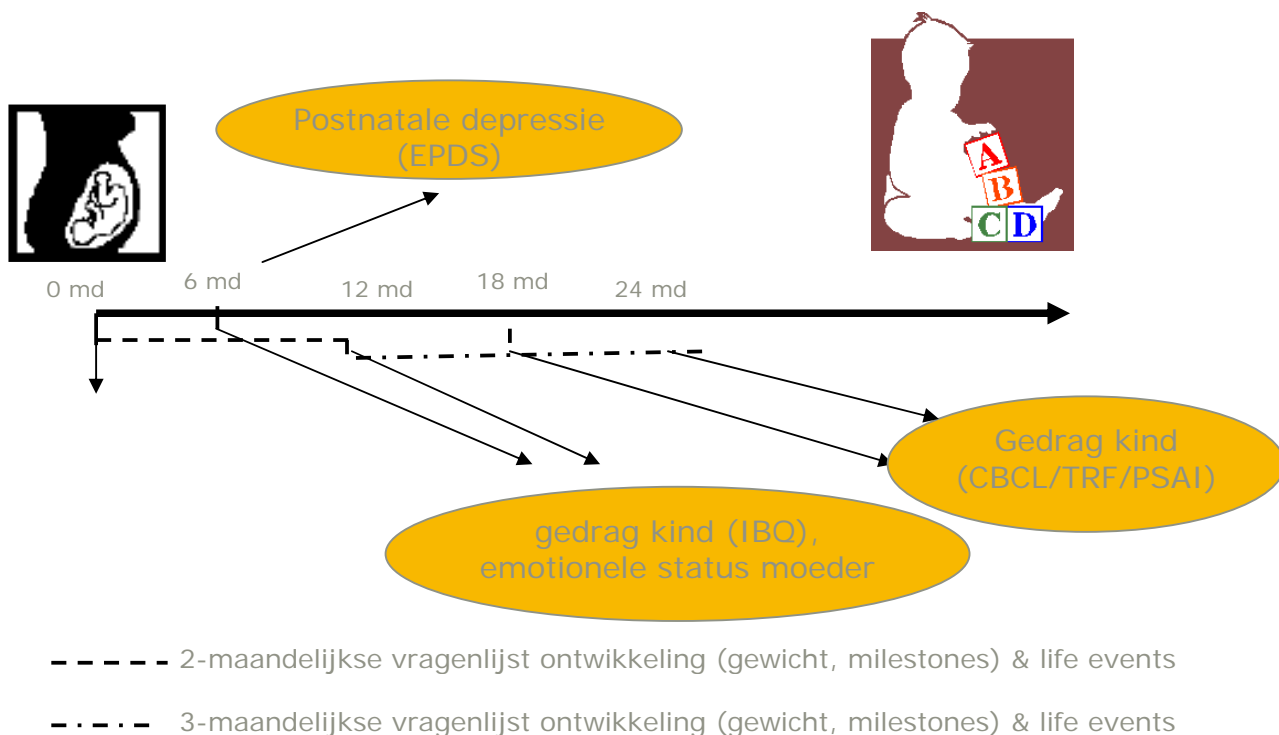
- Gegevens uit het dossier van de bevallen vrouw zullen in de materniteit op een fiche worden genoteerd door de veldwerkers: gewicht, lengte, hoofdomtrek, zwangerschapsduur, complicaties tijdens de zwangerschap, aangeboren afwijkingen, hypospadias, cryptorchidie, resultaten standaard neurologisch onderzoek.
- Gegevens van de centra voor opsporing van metabole ziekten (hielprik): TSH.
- Gegevens van Kind en Gezin: groei en ontwikkelingsgegevens.

3.8. Neurologische opvolgstudie

In de loop van de 2 jaar na de bevalling zullen de moeders op regelmatige tijdstippen vragenlijsten ontvangen om de neurologische ontwikkeling van het kind op te volgen. De neurologische parameters zullen later geassocieerd worden met blootstellingsniveau's van pollutanten in navelstrengbloed (dosis-effect relaties).

De vragenlijsten worden opgestuurd door medewerkers van het Openbaar Psychiatisch Centrum Geel (OPZG) onder verantwoordelijkheid van Prof. dr. M. Viaene. Er wordt een contactpersoon voorzien voor hulp bij de vragen, en voor eventuele medische vragen. De vragenlijsten kunnen door de deelnemer kosteloos worden teruggestuurd naar het OPZG.

In onderstaand schema wordt een overzicht gegeven van de vragenlijsten:



Figuur 1: Schematisch overzicht van neurologische opvolgstudie.

Overzicht van vragenlijsten in de neurologische opvolgstudie:

- **Maand 0-1:**
 - stress zwangerschap: via algemene vragenlijst
 - gegevens bevalling: opvragen uit kindfiche
 - vragen over zwangerschap: via algemene vragenlijst
 - STAI/ZVB: extra vragenlijst
- **Maand 6:**
 - screening postnatale depressie (EPDS): extra vragenlijst
 - STAI: extra vragenlijst
 - IBQ: extra vragenlijst
- **Maand 12:**
 - STAI: extra vragenlijst
 - IBQ: extra vragenlijst
- **Maand 18:**
 - CBCL: extra vragenlijst
 - TRF-C: extra vragenlijst
- **Maand 24:**
 - CBCL: extra vragenlijst
 - TRF-C: extra vragenlijst
 - PSAI: extra vragenlijst
- **Gedurende het eerste jaar:**
 - 2-maandelijkse vragenlijst over ontwikkeling en milestones: extra vragenlijst
- **Gedurende het tweede jaar:**
 - 3-maandelijkse vragenlijst over ontwikkeling en milestones: extra vragenlijst

De tijdsinvestering voor het invullen van de vragenlijst op ieder moment is als volgt:

- 1^e jaar:
 - op 0-1 maanden: 5 minuten
 - op 6 maanden: 10-12 minuten
 - tweemaandelijks: 2-3 minuten
- 2^e jaar:
 - op 12 maanden: 10-12 minuten
 - op 18 maanden: 10-12 minuten
 - op 24 maanden: 12-14 minuten
 - driemaandelijks: 2-3 minuten

Referenties:

Handleiding bij de Zelf-beoordelings vragenlijst ZBV : een Nederlandstalige bewerking van Spielberger State-trait anxiety inventory STAI-DY. - 2e gew. dr. (ZBV 2000/STAI-DY) / Ploeg, H.M. van der. - Lisse : Swets Test Publishers (STP), 2000

Rothbart, M.K. (1981). Measurement of temperament in infancy. *Child Development*, 52, 569-578.

Gartstein, M. A., & Rothbart, M. K. (2003). Studying infant temperament via the Revised Infant Behavior Questionnaire. *Infant Behavior and Development*, 26 (1), 64-86.

Achenbach, T.M., & Rescola, L.A. (2000). Manual for the ASEBA Preschool Forms & Profiles. Burlington, VT: University of Vermont, Research Center for Children, Youth, & Families. (In het Nederlands vertaald door F.C. Verhulst en J. van der Ende van de afdeling kinder- en jeugdpsychiatrie van het Erasmus MC - Sophia).

Cox, J.L., Holden, J.M., and Sagovsky, R. 1987. Detection of postnatal depression: Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *British Journal of Psychiatry* 150:782-786.

K. L. Wisner, B. L. Parry, C. M. Piontek, Postpartum Depression. *N Engl J Med* vol. 347, No 3, 2002, 194-199.

3.9. Kwaliteitsbewaking

De verschillende kritische fasen die kwaliteitsbewaking vereisen zijn:

- Pre-analytische fase

De pre-analytische fase is de fase van het onderzoek waarin het veldwerk wordt voorbereid en uitgevoerd. Concreet houdt deze fase in:

- afname van de stalen: recipiënt controle,
- labelen van de tubes,
- coderen van de stalen (identificatie);
- bewaren van de stalen;
- transport van de stalen;
- opslag van de stalen in veldwerkcoördinatiecentrum en daarna centraliseren in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.

Aandachtspunten die zullen behandeld worden in deze fase zijn:

- Expertise veldwerkers.

- Richtlijnen voor vroedvrouwen en artsen ter voorkoming van contaminatie bij collectie navelstrengbloed (vb: gebruik handschoenen, geen contact tussen bloedstaal en: stiften/plakband of mercurochroom ontsmettingsmiddel)
- Ontwerp van registratiesysteem voor stalen: codeboek.
- Linking tussen de stalen en het informed consent.
- Registratie stalen in materniteit: inschrijven staalcodes.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in veldwerkcoördinatiecentrum.
- Selectiemethode van bloedstalen op basis van informed consent.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.
- Gebruik van visueel kleurcodes op tubes voor verschillende bepalingen op één bloedstaal

□ Analytische fase

In de analytische fase van het onderzoek worden de analyses op de stalen uitgevoerd. Aan de uitvoerende labo' s worden kwaliteitseisen gesteld o.a. op vlak van zuiverheid recipiënten, QA certificaten en/of deelname aan ringtesten, detectielimieten, ervaring met de analyses, kwantitatieve of kwalitatieve meting.

□ Postanalytische fase

In deze laatste fase, na de analyses zal aan volgende stappen aandacht worden besteed:

- Overdracht van analysedata van de analyselabo's naar het coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen: communicatie over resultaten + controle van meeteenheid.
- Archivering van deze originele datafile documenten.
- Dubbele ingave analysedata in een database.
- Kwaliteitscontroles op de ingebrachte gegevens door opvragen van beschrijvende statistiek en door alle waarden buiten het 5-95 ste percentielinterval te controleren tegen de originele documenten.
- Na verwijderen van alle fouten zal één dataset in een beschermde directory op de server van het coördinatiecentrum worden onderhouden.

3.10. Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring

3.10.1. Initiële gegevensverwerking

De vragenlijstgegevens worden gecodeerd op basis van het codeboek en worden ingescand. Open vragen worden manueel ingegeven.

De meetresultaten worden overgenomen uit de elektronische datasheets die worden aangeleverd door de uitvoerende laboratoria.

3.10.2. Statistisch analyseplan

Het primaire doel van de studie is om referentiewaarden te genereren voor Vlaanderen.

De blootstellingsmerkers worden beschreven voor heel Vlaanderen. Waarden van persistente, vetoplosbare polluenten in plasma worden uitgedrukt als concentratie ($\mu\text{g/L}$) en per gram bloedvet. Waarden gemeten in volbloed worden uitgedrukt in $\mu\text{g/L}$ en metingen in haar worden uitgedrukt in $\mu\text{g/gram}$.

Voor iedere biomerker van blootstelling wordt nagegaan of de gegevens normaal verdeeld zijn (boxplots, histogram, Shapiro Wilk test,...). Indien de gegevens niet normaal verdeeld zijn, wordt gezocht naar een geschikte transformatie (bij voorkeur log transformatie). Er wordt een beschrijvende statistiek gegeven voor de totale groep:

- aantal observaties;
- aantal metingen onder de detectielimiet;
- gemiddelde en standaard deviatie voor data die normaal verdeeld zijn; geometrisch gemiddelde en 95% betrouwbaarheidsinterval voor getransformeerde data;
- percentielen: p5, P10, P25, P50, P75, P90, P95.

Daarnaast worden beschrijvende statistiek gegeven per categorie van de voornaamste confounders, namelijk apart resultaten per:

- leeftijd van de moeder: per klasse van 5 jaar;
- rookstatus: nooit gerookt, ex-roker, huidig roker;
- BMI: ondergewicht (BMI<18 kg/m²), normaal gewicht (BMI: 18-24.9 kg/m²), overgewicht (BMI: 25-29.9 kg/m²), obesitas (BMI>29.9 kg/m²);
- sociale klasse: categorie op basis van opleiding en/of inkomen
- op basis van woonplaats: stedelijk vs.niet-stedelijk

Voor individuele merkers kan nog een onderverdeling gemaakt worden op basis van andere confounders. Dit wordt nog gedetailleerd nagekeken in de literatuur en in de huidige populatie bestudeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een tweede doel van de studie is om associaties te bestuderen tussen blootstelling aan pollutanten en gezondheidseffecten.

Voor alle bestudeerde effectmerkers wordt eerst een beschrijvende statistiek (N, gemiddelde en spreidingsmaat, percentielen) gegeven. De biomerkers van effect zijn:

- geboorteparameters: zwangerschapsduur, prematuriteit;
- groei van de neonatus: gewicht, lengte, hoofdomtrek;
- hormonen in navelstrengbloed: schildklierhormonen, sex hormonen, metabole hormonen;
- allergie en infecties bij de moeder: astma, hooikoorts, dierenallergie, voedselallergie, huidallergie, luchtweginfecties;
- vruchtbaarheid bij de moeder: 'time to pregnancy', vruchtbaarheidsbehandeling, miskramen;
- neurologisch: milestones in de ontwikkeling (zitten, kruipen,...), gedragsvariabelen en temperament van het kind (Infant Behavior Questionnaire, CBCL, TRF, PSAI), groei (lengte, hoofdomtrek).

Verklarende parameters van de biomerker van effect worden geïdentificeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een dosis-effect relatie geeft de samenhang tussen een effectmerker (effect) en een blootstellingmerkers (dosis) weer. Om deze verbanden te kwantificeren wordt gebruik gemaakt van lineaire regressiemodellen voor continue effectmerker en logistische regressiemodellen voor binaire effectmerkers. Elk model bevat steeds de confounders die reeds eerder geïdentificeerd werden voor de effectmerker; daarnaast is ook de blootstellingmerker opgenomen in het model.

4. Adolescenten

Voor de selectie van 14-15-jarige jongeren wordt er gewerkt via secundaire scholen.

4.1. Selectie scholen

Voor de selectie van de scholen wordt er een lijst opgesteld van alle middelbare scholen in Vlaanderen (info van ministerie van onderwijs). Speciale scholen zoals Steiner school, Freinet school, joodse school, BUSO school (Buitengewoon Secundair Onderwijs) komen niet in aanmerking omdat het leidt tot clustering van een bepaalde categorie van leerlingen of omdat de vragenlijst voor deze leerlingen te moeilijk kan zijn.

Secundaire scholen met minimaal 100 leerlingen in het derde leerjaar, in een ASO, TSO of BSO richting komen in aanmerking.

Per provincie worden er twee scholen geselecteerd voor de biomonitoring. De kans op selectie van de school is enerzijds evenredig met het aantal leerlingen in het derde jaar, en anderzijds van het aanbod van de school. Een school die zowel ASO, TSO en BSO aanbiedt, heeft meer kans om geselecteerd te worden dan een even grote school die enkel TSO en BSO aanbiedt.

Nadat de eerste school geselecteerd is, worden alle scholen uit dezelfde stad of binnen een straal van 20 km uit de lijst verwijderd. Hierdoor voorkomt men dat alle stalen uit een zelfde gebied zouden komen. Vervolgens wordt uit deze gereduceerde lijst een tweede school geselecteerd; waarbij de kans op selectie evenredig is met factor die bepaald wordt door het aantal leerlingen én het aanbod (indien de eerst geselecteerde school ASO of TSO of BSO niet aanbiedt moet deze richting zeker aangeboden worden in de tweede geselecteerde school).

4.2. Selectie jongeren

Deelnemers zijn jongeren uit het derde jaar secundair onderwijs, die maximum één jaar hebben overgedaan, m.a.w. jongeren die geboren zijn in 1992 of 1993 bij rekrutering in het schooljaar 2007-08; of die geboren zijn in 1993 of 1994 indien de rekrutering gebeurt in het schooljaar 2008-09.

In iedere geselecteerde school worden klassenlijsten opgevraagd van alle leerlingen van het derde jaar en worden de leerlingen geselecteerd die geboren zijn in 1992/93 (schooljaar 2007-2008) of 1993/94 (schooljaar 2008-2009). Deze jongeren worden allemaal gevraagd een informed consent in te vullen. Aan de jongeren die niet wensen deel te nemen wordt gevraagd anoniem informatie in te vullen over de reden hiervoor.

Uit de jongeren die wensen deel te nemen, wordt vervolgens een steekproef van leerlingen getrokken. Het is niet wenselijk klassen te selecteren. Door de selectie te doen op het niveau van de adolescent voorkomt men dat alle jongeren bijv. de opleiding automechaniek volgen. Deze jongeren hebben een vergelijkbare blootstelling.

Bij de selectie van de leerlingen wordt rekening gehouden met de verhoudingen ASO/TSO/BSO zoals deze op Vlaams niveau voorkomen. Om op het einde van de studie bij te kunnen sturen zullen de scholen die de drie richtingen aanbieden als laatste bemonsterd worden; om eventuele tekorten in een van de drie richtingen aan te kunnen vullen.

Indien er in een bepaalde school meer dan 20 leerlingen bevroegd moeten worden, wordt ook hier met twee staalname-momenten gewerkt. Globaal zal getracht worden om de staalname-momenten gelijkmatig te verdelen over de vier seizoenen.

Middelbare scholen hebben doorgaans leerlingen uit een ruimere regio rondom de school. Ook voor deze leeftijdsklasse verwachten we dat jongeren uit een ruimere geografische eenheid in de studie opgenomen gaan worden.

Voorwaarden voor inclusie deelnemende jongeren:

- Geboren zijn in het jaar 1994, 1993 of 1992;
- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen;
- Toestemming van de ouders én de jongere (informed consent), d.w.z. bereid zijn om een bloedstaal, urinestaal en haarstaal te leveren, een uitgebreide vragenlijst in te vullen en een computertest uit te voeren
- Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen.

4.3. Contact met scholen

- Contact opnemen met de directeur van de geselecteerde scholen. Persoonlijk bezoek door één van de medewerkers om programma uit te leggen. Vragen om medewerking. Vragen naar contactpersoon (bijv. leraar biologie, verpleegster van de school,...) die studie wil uitleggen en leerlingen kan motiveren en die praktische regelingen organiseert (uitdelen en ophalen van brieven, enz.)
- Naargelang de lokale gebruiken ook informeren en/of toestemming vragen aan de inrichtend macht.
- Briefing directeur, secretariaat en leerkrachten en afspreken van de procedures.
- Selectie van de periode waarin het veldwerk zal worden uitgevoerd. De brieven aan de ouders worden ongeveer twee weken vooraf meegegeven.
- Beloning voor de jongeren

4.4. Potentiële deelnemers

Een geïnformeerd toestemmingsformulier met uitleg over de biomonitoring wordt voorgelegd aan de jongeren en hun ouders. Dit gebeurt via de school ongeveer 2 weken voor het onderzoek zal doorgaan. In het informed consent zal kort vermeld worden welke analyses op bloed, urine en haar worden uitgevoerd. Tevens vragen we zowel aan de ouders als aan de adolescent om een algemene vragenlijst in te vullen.

Er wordt verder gewezen op het feit dat:

- Niet alle jongeren geselecteerd worden voor de studie: enkel deelname als voldaan is aan de inclusiecriteria en als het aantal deelnemers dat gerekruteerd werd nog onvoldoende is.
- Privacy zal beschermd worden: gebruik codenummers.
- Deelnemers recht hebben zich terug te trekken uit de studie.
- De reststalen van bloed, urine en haar bewaard blijven voor eventuele toekomstige analyses (biobank).
- Deelnemers recht hebben op informatie omtrent procedures en het onderzoeksproject in zijn geheel (via hoofdonderzoeker).
- Er een beloning wordt voorzien voor de jongeren

4.5. Procedure voor veldwerk

4.5.1. Coördinatie veldwerk

Het PIH-Antwerpen zal de volgende taken uitvoeren:

- Benaderen van scholen, maken van afspraken voor onderzoeken
- Bezorgen van informatie en consentformulieren, vragenlijsten jongere, ouders
- Op de onderzoeksdag: nakijken van de informed consent formulieren en opdelen van de jongeren in volgende groepen:

(a) toestemming gegeven **en** \geq 10 jaar wonen in Vlaanderen **en** Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen

→ uitvoeren van veldwerk en verwerken van stalen.

(b) jongeren geen toestemming gegeven **of** ouders geen toestemming gegeven **of** $<$ 10 jaar wonen in Vlaanderen **of** geen Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen

→ geen verwerking van stalen (een eventueel geleverd urinestaal en/of ingevulde vragenlijst wordt vernietigd) en deelnemer wordt niet in de studie gesloten.

- Bloedname
- Urinestaal controleren en indien nodig een nieuw staal vragen
- Wegen en meten van jongeren met geijkte weegschaal en meetlat
- Vragenlijst recente blootstelling bezorgen
- Bezorgen beloning

4.5.2. Afname en initiële verwerking van urine

Samen met de vragenlijsten wordt vooraf een potje voor urinecollectie aan de adolescenten meegegeven via de school. Er worden instructies meegegeven aan de jongere om op de dag van het onderzoek ochtendurine te collecteren in dit potje en het mee te brengen naar het onderzoek. Indien er onvoldoende volume is, wordt dit geregistreerd, maar er wordt geen extra staal gevraagd. Indien de deelnemer zijn urinestaal vergeet of niet in het juiste recipiënt heeft gecollecteerd, wordt er gevraagd om opnieuw een urinestaal te leveren in de loop van de onderzoeksdag.

Conditie voor collectie:

- Potje van 500 mL urine, vrij van metalen en weekmakers.
- Potje labelen met identificatiecode

4.5.3. Afname en initiële verwerking van bloed

Tijdens het veldwerk in de school wordt bloed afgenomen in een afgesloten locatie binnen de school, waar het nodige materiaal kan worden gezet (ligstoel, rekken met buisjes, ontsmettingsmateriaal, centrifuge).

Het prikken gebeurt met een vliedernaaldje en de verschillende tubes worden opeenvolgend gevuld. In totaal wordt er 42,5 mL bloed afgenomen (overzicht: zie 4.5.5 en 4.5.6). Het prikschema met soort en aantal tubes werd uitgewerkt in een apart draaiboek.

4.5.4. Afname van haarstaal

Er wordt een staal van het haar afgenomen bij de jongere.

- ❑ Aanbevolen locaties zijn het onderste en bovenste deel van de nek en de zijkant van het hoofd.
- ❑ Voor het knippen wordt een schaar van roestvrij staal gebruikt.
- ❑ Enkel de 2,5 cm van het haar, het dichtst tegen de schedel wordt behouden (nieuwgroei). De rest van het haar wordt afgeknipt en weggegooid.
- ❑ Een staal kan bestaan uit kleine porties die genomen werden op verschillende locaties van de schedel. De totale hoeveelheid haar dient ongeveer een goed gevulde theelepel te bedragen (100-150 mg).
- ❑ Het haar wordt bewaard in speciale huls die vrij is van metalen.
- ❑ De huls wordt gelabeld met de identificatiecode en bewaard bij kamertemperatuur.

4.5.5. Neurologische testen

Bij de jongeren worden testen afgenomen om volgende neurologische effectmerkers te meten:

- 1) aandacht (Continuous Performance test);
- 2) snelheid van psychomotoriek (Symbol Digit Substitution test);
- 3) oog-hand coördinatie (NES 3 test voor visuele acuraatheid van de psychomotoriek).

De subtesten worden geïntegreerd aangeboden in een gecomputeriseerd testsysteem: NES3 (Neurobehavioral Evaluation System), die vooral motorische functie, snelheid van informatieverwerking, complexe en volgehouden aandacht, en korte en lange termijn geheugen test. Aanvullend wordt een korte vragenlijst geïntegreerd in de NES 3 die toelaten 'Gender specific', apathisch pseudodepressief gedrag en antisociaal ('conduct behavioural disorder') gedrag in te schatten.

In praktijk worden 2 laptops voorzien waar de jongeren tijdens de periode van het veldwerk de testen kunnen afleggen. De totale test duurt ongeveer 10 à 15 minuten.

Referenties:

Letz R. NES3 user's manual. Atlanta (GA): Neurobehavioral Systems Inc.; 2000.

Letz R. Continuing challenges for computer-based neuropsychological tests. *Neurotoxicology* 2003;24:479-89.

4.5.6. Verwerking van stalen en analyses

De bloed-, serum-, urine- en haarstalen worden getransporteerd naar VITO-Milieutoxicologie voor verdere verwerking:

- (a) aliquoteren van bloed-, serum-, haar- en urinestalen in de verschillende analysetubes
- (b) stockeren van stalen tot analyse
- (c) transport van analysetubes naar uitvoerende laboratoria
- (d) stockeren van reststalen voor biobank

Overzicht van de analyses die zullen uitgevoerd worden:

- (a) Metingen van blootstellingsmerkers in perifere bloed
- **zware metalen: 2 mL bloed:**
 - lood, cadmium, arseen, nikkel, cobalt, chroom
 - **gechloreerde en gebromeerde persistente polluenten: 4 mL serum:**
 - merker PCBs
 - gechloreerde pesticiden: HCB en p,p'-DDE
 - polygebromeerde diphenylethers (merker PBDEs)
 - hexabromocyclododecaan (HBCD)
 - **bisphenol A: 1,5 mL serum:²**
 - tetrabromobisphenol A (TBBPA)
 - bisphenol A (BPA)
 - **dioxine-achtige stoffen: 5 mL serum:**
 - Calux assay
 - **musk derivaten: 5 mL bloed:²**
 - musk xyleen, galaxolide, tonalide, musk keton
- (b) Metingen van effectmerkers in perifere bloed
- **genotoxiciteit: 1 mL bloed (isolatie lymfocyten):**
 - komeettest
 - **hormonen: 2,5 mL serum:**
 - schildklierhormonen: TSH, fT3, fT4
 - sex hormonen: testosteron, estradiol, LH, SHBG, FSH, inhibine B (enkel jongens)
 - **correctiefactoren voor andere metingen: 1 mL serum:**
 - triglyceriden, totaal cholesterol, serum ferritine
 - **genexpressie-analyse: 2,5 mL bloed (paxgene tube)**
 - genexpressie
Motivatie bij genexpressie: Onderzoek van Prof. Kleinjans (Universiteit Maastricht) tijdens het vorig steunpunt heeft aangetoond dat genexpressie-onderzoek zelfs bij jonge kinderen tot relevante resultaten aanleiding geeft. Het lijkt wenselijk de expressie van een twintigtal met kanker verband houdende genen te onderzoeken. In de eerste plaats de genen CYP1B1, SOD2, ATF4, MAPK14, CXCL1, PINK1, DGAT2 en TIGD3, aan te vullen met nog een aantal andere relevante genen. Bijkomende genen zullen geselecteerd worden op basis van een dubbele benadering. Vooreerst op basis van een mechanistische benadering die zal steunen op een uitgebreid literatuuronderzoek. Vervolgens op basis van een studie van databanken inzake genexpressie, waarbij de expressie van kandidaatgenen, in relatie tot bepaalde toestanden of blootstellingen, zal bekeken worden.
Referentie: van Leeuwen DM, Gottschalk RWH, Schoeters G, Kleinjans JCS, van Delft JHM. Biomonitoring of differential gene expressions in peripheral blood in selected environmentally exposed human populations in Flanders. PhD thesis, Chapter 6,

² Metingen worden pas uitgevoerd indien de haalbaarheid en accuraatheid van de meting getest is op gepoolde bloedstalen uit de volwassenencampagne. Indien de meting niet wordt uitgevoerd, wordt het bloedstaal opgenomen in de biobank.

- (c) Metingen van blootstellingsmerkers in urine
- **Zware metalen: 4 mL urine:**
 - totaal arseen en toxisch relevant arseen (TRA)
 - **Vluchtige stoffen: 4 mL urine:**
 - t,t'-muconzuur (metaboliët van benzeen)
 - 1-hydroxypyreen (metaboliët van PAKs)
 - **Ftalaten: 10 mL urine:**
 - metaboliëten van ftalaten: MBP, MBzP, MEHP (primaire metaboliëten); 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP (secondaire metaboliëten)
 - **Pesticiden: 14 mL urine:**
 - DETP, DEP, DMTP, DMP, DEDTP, DMDTP (metaboliëten van organofosfaat-pesticiden)
 - 2,5-DCP (metaboliët van p-dichloorbenzeen)
 - **Parabenen: 5 mL urine:**³
 - para-hydroxybenzoëzuur (metaboliët van parabenen)
- (d) Metingen van effectmerkers en confounders in urine
- **genotoxiciteit: 0,5 mL urine**
 - 8-OH-deoxyguanosine
 - **Cotinine en creatinine: 1 mL urine:**
 - cotinine, creatinine
 - **Specifieke graviteit: 2 mL urine:**
 - specifieke graviteit
- (e) Metingen in haar van de moeder
- **Zware metalen: 100-150 mg haar:**
 - kwik en methylkwik

Tabel 5: Overzicht van benodigde hoeveelheid staal bij adolescenten voor uitvoeren van geplande metingen

Matrix	Hoeveelheid
Perifeer bloed	- 10,5 mL volbloed - 14 mL serum = 28 mL bloed Totaal: 38,5 mL bloed
Urine	40,5 mL urine
Haar	100-150 mg haar

Bij het aliquoteren van de stalen wordt een prioriteitschema vastgelegd, zodat vooraf vastligt welke metingen wegvallen indien er minder bloed is dan gepland.

4.5.7. Biobank

Binnen het huidige biomonitoringsproject wordt gestart met de opbouw van een biobank. Het doel is om reststalen en extra stalen te bewaren zodat eventueel later te plannen analyses nog kunnen worden uitgevoerd.

³ Metingen worden pas uitgevoerd indien de haalbaarheid en accuraatheid van de meting getest is op gepoolde urinestalen uit de volwassenencampagne. Indien de meting niet wordt uitgevoerd, wordt het urinestaal opgenomen in de biobank.

Bij de aanleg van de biobank wordt rekening gehouden met volgende aspecten:

- **Wettelijke en ethische aspecten:**
 - Het principe van biobank wordt uitgelegd in het toestemmingsformulier van de deelnemer.
 - Alle stalen worden vernietigd indien de deelnemer uit de studie stapt; reeds uitgevoerde metingen blijven behouden in de databank.
 - Enkel onderzoekers die behoren tot het onderzoeksconsortium kunnen voorstellen doen voor nieuwe metingen.
 - Voor iedere nieuwe meting wordt een aanvraag ingediend bij de ethische commissie.
 - Het beheer van de biobank tijdens het huidige Steunpunt Milieu & Gezondheid (2007-2011) valt onder verantwoordelijkheid van het Dagelijks Bestuur, met toezicht van de Stuurgroep. Bij het einde van het onderzoeksprogramma wordt beslist wie de biobank verder zal beheren. Dit gebeurt in overleg tussen de opdrachtgever (Vlaamse overheid) en het onderzoeksconsortium.
 - Deelnemers en hun ouders worden bij het eind van de studie (eind 2011) geïnformeerd over de metingen die werden uitgevoerd, en de verdere planning voor het beheer van de biobank. Er wordt een contactadres voorzien waar men terecht kan voor informatie over de biobank.

- **Beheer en kwaliteitsgaranties van de biobank:**
 - De biobank wordt beheerd door Vito.
 - Voor ieder staal worden de optimale bewaarconditie voorzien, nl. aangepaste temperatuur (4°C, -20°C, -80°C, N₂), optimaal recipiënt en volume. Er wordt een uniforme manier van labels gebruikt.
 - Er wordt een beveiligingssysteem voorzien voor temperatuursgaranties (alarmsysteem, CO₂-back-up, reservecapaciteit voor diepvriezers). Er wordt een logboek bijgehouden met o.a. temperatuursregistratie, accidentele verhoging.
 - Er worden op regelmatige tijdstippen herhaalde metingen uitgevoerd van een aantal geselecteerde routinemetingen om de kwaliteit van de stalen op te volgen.
 - Voor de registratie en het beheer van de stalen wordt een aparte database voorzien, die onder toezicht staat van een datamanager. Het beheerssysteem moet toelaten om de historiek en de plaats van ieder staal snel en efficiënt te traceren. De database met stalenregister staat op zich, maar kan op eenvoudige wijze worden gekoppeld aan de databank met vragenlijstgegevens en meetresultaten.

- **Praktische uitwerking van biobank bij de adolescentencampagne**
 - **Bloed**
 - Er worden momenteel metingen gepland op 38,5 mL bloed (zie tabel 5).
 - In totaal zal 40 mL bloed worden genomen. Hierdoor wordt een kleine reserve opgebouwd. Daarnaast zullen er nog andere kleine restfracties zijn (bijv. bij meisjes worden geen sex hormonen gemeten, sommige laboratoria hebben nog reststaal na het uitvoeren van de meting; volumes die niet gebruikt worden om de haalbaarheid van de metingen na testing niet voldoende groot is (zie 5.5.7)).
 - De reststalen van bloed en serum worden ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank. De historiek van de stalen wordt geïnventariseerd.

- Bij jongeren waarbij de bloedname mislukt, of waarbij de bloedname te vroeg stopt, wordt gevraagd dat de urinestalen en eventuele bloedstalen in de biobank mogen bewaard worden. De gegevens van de vragenlijsten worden gebruikt. Er wordt geen haarstaal genomen en geen NES test uitgevoerd. De jongeren ontvangen een beperkt resultaat: zware metalen in bloed en urine. Deze procedure werd vooraf vermeld in de begeleidende brief bij de studie en wordt nog eens uitgelegd aan de jongere tijdens het veldwerk.

- **Urine**
 - Er worden momenteel metingen gepland op 40,5 mL urine (zie tabel 5).
 - Er wordt een staal van 250 mL gevraagd.
 - Het reststaal van urine wordt ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank.

- **Haar**
 - Er wordt een haarstaal van 100-150 mg genomen.
 - Hierop wordt één meting voorzien.
 - De rest van het haar wordt bewaard onder de juiste bewaarcondities (nog te beslissen).

Tabel 6: Overzicht van finale volumes bij adolescenten

Matrix	Totaal volume	Nodig voor analyse	Biobank
Bloed	40 mL	38,5 mL	1,5 mL + eventuele resten
Urine	250 mL	40,5 mL	210 mL
Haar	100-150 mg	fractie	rest

4.6. Vragenlijsten

Er wordt gevraagd aan de ouders en de adolescent om samen een algemene vragenlijst in te vullen omtrent gezinssamenstelling, gezondheid van de jongere, woning, hobby's, voeding en perceptie over milieu en gezondheid.

Daarnaast krijgt de adolescent tijdens het veldwerk nog een korte vragenlijst over recente blootstelling (laatste 3 dagen), roken, alcohol, tijdsbesteding en pilgebruik bij meisjes. Er is ook een aparte vragenlijst om een score voor ADHD te meten (SDQ vragenlijst).

Deze vragen worden best ingevuld zonder toezicht van de ouders en worden daarom tijdens het veldwerk in de school afgenomen.

4.7. Verzamelen van data uit bestaande databanken

De voornaamste reden waarom gekozen wordt voor jongeren van het derde jaar secundair onderwijs is dat deze leeftijdsgroep een uitgebreid puberteitsonderzoek krijgt van de schoolarts. Jongeren en hun ouders geven in het informed consent toestemming om CLB gegevens van het medisch schoolonderzoek op te vragen. Via het CLB (Centrum voor Leerlingenbegeleiding) wordt aan de schoolarts gevraagd om gegevens uit het medisch dossier. Afhankelijk van centrum tot centrum wordt de informatie in de dossiers opgezocht door onze studieverpleegsters, of wordt de informatie elektronisch doorgegeven door de verpleegsters van de CLBs.

Zowel voor jongens als voor meisjes worden de puberteitsstadia (schaal van Marshal & Tanner) opgevraagd. Voor jongens wordt tevens informatie gevraagd over testisvolume (orchidometer) en het voorkomen van hypospadias, cryptorchidie of gynecomastie.

4.8. Kwaliteitsbewaking

De verschillende kritische fasen die kwaliteitsbewaking vereisen zijn:

□ Pre-analytische fase

De pre-analytische fase is de fase van het onderzoek waarin het veldwerk wordt voorbereid en uitgevoerd. Concreet houdt deze fase in:

- afname van de stalen: recipiënt controle,
- labelen van de tubes,
- coderen van de stalen (identificatie);
- bewaren van de stalen;
- transport van de stalen;
- opslag van de stalen in veldwerkcoördinatiecentrum en daarna centraliseren in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.

Aandachtspunten die zullen behandeld worden in deze fase zijn:

- Expertise veldwerkers o.a. ivm bloedname.
- Ontwerp van registratiesysteem voor stalen: codeboek.
- Linking tussen de stalen en het informed consent.
- Registratie stalen in de school: inschrijven staalcodes.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in veldwerkcoördinatiecentrum.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.
- Gebruik van visueel kleurcodes op tubes voor verschillende bepalingen op één bloedstaal

□ Analytische fase

In de analytische fase van het onderzoek worden de analyses op de stalen uitgevoerd. Aan de uitvoerende labo's worden kwaliteitseisen gesteld o.a. op vlak van zuiverheid recipiënten, QA certificaten en/of deelname aan ringtesten, detectielimieten, ervaring met de analyses, kwantitatieve of kwalitatieve meting.

□ Postanalytische fase

In deze laatste fase, na de analyses zal aan volgende stappen aandacht worden besteed:

- Overdracht van analysedata van de analyselabo's naar het coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen: communicatie over resultaten + controle van meeteenheid.
- Archivering van deze originele datafile documenten.
- Dubbele ingave analysedata in een database, voor manueel in te geven data.
- Kwaliteitscontroles op de ingebrachte gegevens door opvragen van beschrijvende statistiek en door alle waarden buiten het 5-95 ste percentielinterval te controleren tegen de originele documenten.

4.9. Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring

4.9.1. Initiële gegevensverwerking

De vragenlijstgegevens worden gecodeerd op basis van het codeboek en worden ingescand. Open vragen worden manueel ingegeven.

De meetresultaten worden overgenomen uit de elektronische datasheets die worden aangeleverd door de uitvoerende laboratoria.

4.9.2. Statistisch analyseplan

Het primaire doel van de studie is om referentiewaarden te genereren voor Vlaanderen.

De blootstellingsmerkers worden beschreven voor heel Vlaanderen. Metingen van persistente, vetoplosbare pollutanten in serum worden uitgedrukt als concentratie ($\mu\text{g/L}$) en per gram bloedvet; metingen in volbloed worden uitgedrukt in $\mu\text{g/L}$; metingen in haar worden uitgedrukt in $\mu\text{g/gram}$; metingen in urine worden uitgedrukt als concentratie ($\mu\text{g/L}$) en per gram creatinine. Urinestalen met een creatinine waarde $<30 \text{ mg/dL}$ of $>300 \text{ mg/dL}$ worden uitgesloten uit de analyse (Ref: WHO 1996 Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Vol. 1. Geneva, World Health Organisation).

Voor iedere biomerker van blootstelling wordt nagegaan of de gegevens normaal verdeeld zijn (boxplots, histogram, Shapiro Wilk test,...). Indien de gegevens niet normaal verdeeld zijn, wordt gezocht naar een geschikte transformatie (bij voorkeur log transformatie). Er wordt een beschrijvende statistiek gegeven voor de totale groep:

- aantal observaties;
- aantal metingen onder de detectielimiet;
- gemiddelde en standaard deviatie voor data die normaal verdeeld zijn; geometrisch gemiddelde en 95% betrouwbaarheidsinterval voor getransformeerde data;
- percentielen: p5, P10, P25, P50, P75, P90, P95.

Daarnaast worden beschrijvende statistiek gegeven per categorie van de voornaamste confounders, namelijk apart resultaten per:

- geslacht;
- rookstatus: niet-roker, sporadisch roker, dagelijks roker;
- per categorie van cotinine (klassen nog te maken);
- BMI: ondergewicht ($\text{BMI} < 18 \text{ kg/m}^2$), normaal gewicht ($\text{BMI}: 18\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$), overgewicht ($\text{BMI}: 25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$), obesitas ($\text{BMI} > 29.9 \text{ kg/m}^2$);
- sociale klasse: categorie op basis van opleiding en/of inkomen
- woonplaats: stedelijk vs. niet-stedelijk gebied

Voor individuele merkers kan nog een onderverdeling gemaakt worden op basis van andere confounders. Dit wordt nog gedetailleerd nagekeken in de literatuur en in de huidige populatie bestudeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een tweede doel van de studie is om associaties te bestuderen tussen blootstelling aan pollutanten en gezondheidseffecten.

Voor alle bestudeerde effectmerkers wordt eerst een beschrijvende statistiek (N, gemiddelde en spreidingsmaat, percentielen) gegeven. De biomerkers van effect zijn:

- schildklierhormonen;
- puberteitsontwikkeling (puberteitsstadia, leeftijd menarche);
- sex hormonen (enkel bij jongens);
- allergie en infecties: astma, hooikoorts, dierenallergie, voedselallergie, huidallergie, luchtweginfecties;
- komeettest
- resultaten NES test; score op ADHD-vragenlijst.

Hierbij valt op te merken dat power berekeningen gebeurd zijn op basis van de totale groep, en dat voor metingen die enkel bij jongens of enkel bij meisje gebeuren (bijv. puberteit, sex hormonen) de precisie minder groot zal zijn.

Verklarende factoren van de biomerker van effect worden geïdentificeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een dosis-effect relatie geeft de samenhang tussen blootstellingmerkers (dosis) en een effectmerker (gezondheidseffect) weer. Om deze verbanden te kwantificeren wordt gebruik gemaakt van lineaire regressiemodellen voor continue effectmerker en logistische regressiemodellen voor binaire effectmerkers. Elk model bevat steeds de confounders die reeds eerder geïdentificeerd werden voor de effectmerker.

5. Volwassenen

Voor de groep van jong volwassenen (20-40 jaar) wordt er binnen de **provinciebesturen** gerekruteerd.

Voordelen van deze aanpak:

- Werknemers van het provinciebestuur zijn afkomstig uit een groter geografische gebied.
- Er werken mensen van verschillende sociale klassen (niveau A - universiteit; B - hogeschool; C - hoger middelbaar; D - lager middelbaar; E - lager onderwijs of geen onderwijs) die verschillende activiteiten uitoefenen (administratie, poetspersoneel, buitendiensten,...).
- Het merendeel van deze werknemers heeft geen beroepsblootstelling (tenzij in het verleden).
- Het veldwerk vereenvoudigt sterkt als men via de provinciebesturen werkt. De deelnemers kunnen tijdens werkuren gecontacteerd worden. Bloedname kan in het hoofdgebouw of een paar centrale locaties en tijdens de werkuren gebeuren.
- Er wordt een hoge respons verwacht omdat deelname weinig extra inspanning vraagt (onderzoeken gebeuren tijdens de werkuren) en omdat de studie ondersteund wordt door het provinciebestuur.
- Bij de selectie kan men rekening houden met de leeftijd, geslacht en opleidingsniveau van de deelnemer.

Nadelen van deze aanpak:

- Sommige groepen worden met deze aanpak niet bereikt, bijv. studenten, huismoeders, werklozen,....

5.1. Doelpopulatie.

De doelpopulatie bestaat uit jonge mannen en vrouwen van 20-40 jaar.

Het steekproefkader is een lijst van de werknemers van de verschillende Vlaamse provincies die in de juiste leeftijdscategorie vallen.

5.2. Selectie deelnemers

Uit de lijsten van het personeel wordt een steekproef getrokken. De bedoeling is om 200 mensen te onderzoeken. Tabel 2 geeft weer hoeveel mensen per provincie er onderzocht dienen te worden. Bij het samenstellen van de steekproef zal getracht worden nauw aan te sluiten bij de leeftijdstructuur, de geslachtsverdeling en opleidingsgraad van de Vlaamse bevolking.

Een groot deel van het provinciepersoneel bestaat uit onderwijzend personeel (provinciale scholen). Om geen oververtegenwoordiging te krijgen van onderwijzend personeel, krijgen zij een kleinere selectiekans.

Binnen iedere provincie wordt het gewenste aantal deelnemers, en telkens twee reserve deelnemers geselecteerd. Deze personen worden allen gelijk aangeschreven om het veldwerk niet te vertragen. Personen worden gerekruteerd tot het gewenste aantal binnen de provincie werd bereikt.

Staalname kan op 2 à 3 locaties per provincie gebeuren. Elke deelnemer kiest de locatie die hem het beste uitkomt. Per staalname-moment worden maximaal 20 stalen verzameld. Deze staalname-momenten worden gelijkmatig over de 4 seizoenen verdeeld.

Voorwaarden voor inclusie deelnemers:

- Geboortedatum tussen 1/1/1968 en 31/12/1988;

- Ten minste 10 jaar wonen in Vlaanderen;
- Toestemming gegeven hebben (informed consent), d.w.z. bereid zijn om bloed en urine te leveren en een uitgebreide vragenlijst in te vullen.
- Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen.

5.3. Contact met provinciebestuur

- Contact opnemen met de deputatie van iedere provincie. Persoonlijk bezoek door één van de medewerkers om programma uit te leggen. Vragen om medewerking.
- Informeren en/of toestemming vragen aan de personeelsdirectie
- Selectie van de periode waarin stalen verzameld worden.

5.4. Potentiële deelnemers

De potentiële deelnemers ontvangen een folder en een geïnformeerd toestemmingsformulier met uitleg. In de informed consent wordt vermeld welke analyses op bloed en urine worden uitgevoerd. Tevens vragen we de deelnemers om een algemene vragenlijst omtrent levensstijl/ ziekten/ beroepsblootstellingen en voeding in te vullen.

Er wordt verder gewezen op het feit dat:

- Niet iedereen geselecteerd wordt voor de studie: enkel deelname als voldaan is aan de inclusiecriteria en als het aantal deelnemers dat gerekruteerd werd nog onvoldoende is.
- Privacy zal beschermd worden: gebruik codenummers.
- Deelnemers recht hebben zich terug te trekken uit de studie.
- De reststalen van bloed en urine bewaard blijven voor eventuele toekomstige analyses (biobank).
- Deelnemers recht hebben op informatie omtrent procedures en het onderzoeksproject in zijn geheel (via hoofdonderzoeker).

5.5. Procedure voor veldwerk

5.5.1. Coördinatie veldwerk

Het PIH-Antwerpen zal de volgende taken uitvoeren:

- Contactname en afspraken met de besturen
- Aanschrijven van potentiële deelnemers, bezorgen van info, consent formulier, vragenlijsten
- Nakijken van de informed consent formulieren en opdelen van de deelnemers in volgende groepen:
 - (a) toestemming gegeven **en** \geq 10 jaar wonen in Vlaanderen **en** Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen → uitvoeren van veldwerk en verwerken van stalen.
 - (b) geen toestemming gegeven **of** $<$ 10 jaar wonen in Vlaanderen **of** geen Nederlandstalige vragenlijsten kunnen invullen → geen verwerking van stalen (een eventueel geleverd urinestaal en/of ingevulde vragenlijst wordt vernietigd) en deelnemer wordt niet in de studie gesloten.
- Bloedname
- Urinestaal controleren, indien nodig een nieuw staal vragen

5.5.2. Meting van acute blootstelling aan fijn stof

De acute blootstelling aan fijn stof zal worden gemeten op de locatie, op de dag van het onderzoek met een draagbaar, optisch meettoestel (Aerocet 531, Met One Instruments, Inc.) met metingen die het gemiddelde van 2 minuten integreren. Het toestel werd gekalibreerd met een gravimetrisch meettoestel van de Vlaamse Milieumaatschappij. Kort voor de start van de studie zal opnieuw een kalibratie plaatsvinden. De chronische blootstelling aan fijn stof zal worden geschat aan de hand van de X,Y-coördinaten. Deze zullen worden bepaald met behulp van Geo Information Systems (GIS) en vervolgens zal met behulp van interpolatiemodellen de fijn stof concentratie (jaargemiddelde) worden geschat op de woonplaats van de deelnemer.

5.5.3. Afname en initiële verwerking van urine

Samen met de vragenlijsten wordt een potje voor urinecollectie meegegeven met de geselecteerde deelnemer. Er wordt gevraagd om op de dag van het onderzoek ochtendurine te collecteren in dit potje en het mee te brengen naar het onderzoek. Indien er onvoldoende volume is, wordt dit geregistreerd, maar er wordt geen extra staal gevraagd. Indien de deelnemer zijn urinestaal vergeet of in het verkeerde recipiënt heeft gecollecteerd, wordt er gevraagd om een nieuw urinestaal te leveren tijdens de periode van het veldwerk.

Conditie voor collectie:

- Potje van 500 mL urine, vrij van metalen en weekmakers.
- Potje labelen met identificatiecode

5.5.4. Afname en initiële verwerking van bloed

Tijdens het veldwerk op de locaties van de provinciebesturen wordt bloed afgenomen in een afgesloten ruimte, waar het nodige materiaal kan worden gezet (ligstoel, rekken met buisjes, ontsmettingsmateriaal, centrifuge).

Het prikken gebeurt met een vliedernaaldje en de verschillende tubes worden opeenvolgend gevuld. In totaal wordt er 42,5 mL bloed afgenomen (overzicht: zie 4.5.5 en 4.5.6). Het prikschema met soort en aantal tubes werd uitgewerkt in een apart draaiboek.

5.5.5. Verwerking van stalen en analyses

Bloedstalen voor meting van cardiovaculaire merkers (citraatbuffer) worden ter plaatse ingevroren en bij -20°C getransporteerd naar UZ Gasthuisberg. De overige bloed- en urinestalen worden getransporteerd naar het coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen (VITO-Milieutoxicologie).

Daar staat men in voor de verdere verwerking en behandeling van de stalen:

- (a) overbrengen van bloed-, en urinestalen in de verschillende analysetubes
- (b) stockeren van stalen tot analyse
- (c) transport van analysetubes naar uitvoerende laboratoria
- (d) stockeren van reststalen voor biobank

Overzicht van de analyses die zullen uitgevoerd worden:

- (a) Metingen van effectmerkers en confounders in bloed
- **Cardiovasculaire merkers: 4,5 mL bloed in citraatbuffer + 4 ml EDTA bloed:**
 - bloedplaatjesaggregatie
 - vroegtijdige merkers van atherosclerose: HSP60, ICAM
 - geoxideerd LDL
 - **Hormoonmetingen bij mannen: 0,5 mL bloed:**
 - inhibine B
 - **Perfluoroderivaten: 2,5 mL serum:**
 - perfluoroderivaten: PFOA, PFNA
 - **Confounders: 6 mL bloed:**
 - HDL cholesterol
 - bloedbeeld: bloedplaatjes, hematocriet
 - transferrine
- (b) Metingen van blootstellingsmerkers in urine
- **Zware metalen: 5 mL urine:**
 - arseen, toxisch relevant arseen (TRA)
 - cadmium
 - **Vluchtige stoffen: 4 mL urine:**
 - t,t'-muconzuur (metabooliet van benzeen)
 - 1-hydroxypyreen (metabooliet van PAKs)
 - **Ftalaten: 10 mL urine:**
 - metaboolieten van ftalaten: MBP, MBzP, MEHP (primaire metaboolieten); 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP (secondaire metaboolieten)
 - **Pesticiden: 14 mL urine:**
 - DETP, DEP, DMTP, DMP, DEDTP, DMOTP (metaboolieten van organofosfaat-pesticiden)
 - 2,5-DCP (metabooliet van p-dichloorbenzeen)
 - **Parabenen: 5 mL urine:**
 - para-hydroxybenzoëzuur (metabooliet van parabenen)
- (c) Metingen van effectmerkers en confounders in urine
- **Genotoxiciteit: 0,5 mL urine**
 - 8-OH-deoxyguanosine
 - **Cotinine en creatinine: 1 mL urine:**
 - cotinine, creatinine
 - **Specifieke graviteit: 2 mL urine:**
 - specifieke graviteit

Tabel 7: Overzicht van benodigde hoeveelheid staal bij volwassenen voor uitvoeren van geplande metingen

Matrix	Hoeveelheid
Bloed	- 15 mL volbloed - 2,5 mL serum (=5 mL volbloed) Totaal: 20 mL bloed
Urine	41,5 mL urine

Bij het aliquoteren van de stalen wordt een prioriteitschema vastgelegd, zodat vooraf vastligt welke metingen wegvallen indien er minder bloed is dan gepland.

5.5.6. Biobank

Binnen het huidige biomonitoringsproject wordt gestart met de opbouw van een biobank. Het doel is om reststalen en extra stalen te bewaren zodat eventueel later te plannen analyses nog kunnen worden uitgevoerd.

Bij de aanleg van de biobank wordt rekening gehouden met volgende aspecten:

- Wettelijke en ethische aspecten:
 - Het principe van biobank wordt uitgelegd in het toestemmingsformulier van de deelnemer.
 - Alle stalen worden vernietigd indien de deelnemer uit de studie stapt; reeds uitgevoerde metingen blijven behouden in de databank.
 - Enkel onderzoekers die behoren tot het onderzoeksconsortium kunnen voorstellen doen voor nieuwe metingen.
 - Voor iedere nieuwe meting wordt een aanvraag ingediend bij de ethische commissie.
 - Het beheer van de biobank tijdens het huidige Steunpunt Milieu & Gezondheid (2007-2011) valt onder verantwoordelijkheid van het Dagelijks Bestuur, met toezicht van de Stuurgroep. Bij het einde van het onderzoeksprogramma wordt beslist wie de biobank verder zal beheren. Dit gebeurt in overleg tussen de opdrachtgever (Vlaamse overheid) en het onderzoeksconsortium.
 - Deelnemers worden bij het eind van de studie (eind 2011) geïnformeerd over de metingen die werden uitgevoerd, en de verdere planning voor het beheer van de biobank. Er wordt een contactadres voorzien waar men terecht kan voor informatie over de biobank.

- Beheer en kwaliteitsgaranties van de biobank:
 - De biobank wordt beheerd door Vito.
 - Voor ieder staal worden de optimale bewaarconditie voorzien, nl. aangepaste temperatuur (4°C, -20°C, -80°C, N₂), optimaal recipiënt en volume. Er wordt een uniforme manier van labellen gebruikt.
 - Er wordt een beveiligingssysteem voorzien voor temperatuursgaranties (alarmsysteem, CO₂-back-up, reservecapaciteit voor diepvriezers). Er wordt een logboek bijgehouden met o.a. temperatuursregistratie, accidentele verhoging.
 - Er worden op regelmatige tijdstippen herhaalde metingen uitgevoerd van een aantal geselecteerde routinemetingen om de kwaliteit van de stalen op te volgen.
 - Voor de registratie en het beheer van de stalen wordt een aparte database voorzien, die onder toezicht staat van een datamanager. Het beheerssysteem moet toelaten om de historiek en de plaats van ieder staal snel en efficiënt te traceren. De database met stalenregister staat op zich, maar kan op eenvoudige wijze worden gekoppeld aan de databank met vragenlijstgegevens en meetresultaten.

- Praktische uitwerking van biobank bij de volwassenencampagne
 - **Bloed**
 - Er worden momenteel metingen gepland op 20 mL bloed (zie tabel 7).
 - In totaal zal 28,5 mL bloed worden genomen, deels als volbloed en deels als serum.
 - De reststalen van bloed en serum worden ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank.
 - Daarnaast wordt aan de deelnemers tijdens de bloedname gevraagd of ze bereid zijn om nog een extra bloedstaal van 10 mL af te staan voor de aanmaak van gepoolde stalen. Deze procedure stond reeds vermeld in de informatiebrochure die de deelnemer vooraf had ontvangen (zie 5.5.7.).
 - **Urine**
 - Er worden momenteel metingen gepland op 41,5 mL urine (zie tabel 7).
 - Er wordt een staal van 250 mL gevraagd.
 - Het reststaal van urine wordt ingevroren in een aantal fracties en bewaard in de biobank.

Tabel 8: Overzicht van staalnames bij volwassenen

Matrix	Totaal volume	Nodig voor analyse	Biobank
Bloed	28,5 mL	20 mL	8,5 mL
Urine	250 mL	41,5 mL	208,5 mL

5.5.7. Metingen in mengstalen

Sommige van bovenstaande metingen in bloed en urine zijn in Vlaanderen nog nooit uitgevoerd op grote schaal. De metingen zijn kostelijk, de te verwachten niveaus zijn enkel uit de literatuur gekend, en er is niet altijd ervaring in samenwerking met het uitvoerende lab. Om de methodologie uit te testen en om een idee te krijgen over de te verwachten niveaus bij jongeren en volwassenen, zullen sommige metingen vooraf in anonieme, gepoolde stalen gemeten worden. Eventueel kunnen herhaalde metingen worden uitgevoerd om reproduceerbaarheid te testen. Op deze manier wordt de haalbaarheid van de meting getest.

De aanmaak van gepoolde stalen wordt enkel uitgevoerd in de volwassenencampagne, omdat hier nog reservecapaciteit is in het nemen van bloed en urine, maar de stalen dienen om metingen te controleren in de volwassenencampagne én in de adolescentencampagne. We kunnen aannemen dat, indien de niveau's te laag zijn bij jong volwassenen, dat we ze ook best niet op grote schaal meten bij de jongeren.

Het gaat om volgende metingen:

- TBBPA en BPA in bloed (1,5 mL serum per meting)
- PFOS en PFNA in bloed (2,5 mL serum per meting)
- musk derivaten in bloed (5 mL bloed per meting)
- p-hydroxy-benzoëzuur in urine (5 mL urine per meting)

Daarnaast wordt een aantal metingen enkel uitgevoerd in de gepoolde stalen. Op deze manier krijgen we een eerste indicatie van de te verwachten niveaus in Vlaanderen. Deze metingen worden echter niet uitgevoerd op de individuele stalen omdat de methode nog experimenteel is

en/of omdat we kunnen verwachten dat een aanzienlijk aandeel van de stalen onder de detectielimiet zal liggen.

Het gaat om volgende metingen:

- parabenen in bloed (5 mL serum per meting)
- UV screens (benzophenon, camphor, cinamaten) in bloed (5 mL serum per meting)
- MPA, 3-PBA, FPBA, c/t-DCVA en t-DBVA in urine (metaboliëten van pyrethroïde pesticiden) (25 mL urine)
- 2,4-D in urine (metaboliëten van dichlorophenoxy-azijnzuur) (4 mL urine per meting)
- ETU in urine (metaboliëten van carbamaatpesticide) (25 mL urine per meting)
- 3,4-DCA 3,5-DCA, DCPU en DCPMU in urine (metaboliëten van pesticiden o.a. diuron, linuron, iprodion) (25 mL urine per meting)
- BaP tetrol en 1,2-naftol in urine (metaboliëten van PAKs) (volume nog niet gekend)

Aan volwassenen waarbij de bloedname vlot verloopt, wordt gevraagd om een extra tube bloed van 10 mL bloed te geven. Dit wordt bij 10 deelnemers per provincie gevraagd. **De totale bloedname voor deelnemers die extra bloed willen geven komt dan op 38,5 mL per individu.** Per provincie worden de stalen gepoold tot 1 mengstaal; er zullen dus 5 mengstalen van 100 mL bloed beschikbaar zijn.

Daarnaast wordt van 10 deelnemers per provincie (at random geselecteerd) een hoeveelheid urine (20 mL) uit het reststaal genomen om gepoolde urinestalen aan te maken. Per provincie worden de stalen gepoold tot 1 mengstaal; er zullen dus 5 mengstalen van 200 mL urine beschikbaar zijn.

Voor de onderzoeken die worden uitgevoerd op mengstalen zijn geen individuele resultaten beschikbaar.

Tabel 9: Overzicht van finale volumes bij volwassenen

Matrix	Totaal volume	Nodig voor analyse	Biobank	Gepoolde stalen
Bloed				
- normaal	28,5 mL	20 mL	8,5 mL	0 mL
- bij gepoold staal*	38,5 mL	20 mL	8,5 mL	10 mL
Urine				
- normaal	250 mL	41,5 mL	208,5 mL	0 mL
- bij gepoold staal*	250 mL	41,5 mL	198,5 mL	20 mL

* aan 10 deelnemers per provincie wordt gevraagd om een extra tube van 10 mL te geven voor het aanmaken van gepoolde stalen

5.6. Vragenlijsten

Er wordt gevraagd we aan de deelnemer om thuis een uitgebreide algemene vragenlijst in te vullen omtrent gezinssamenstelling, gezondheid, woning, beroepsblootstelling, hobby's, voeding en perceptie over milieu en gezondheid.

Daarnaast krijgt de deelnemer tijdens het veldwerk nog een korte vragenlijst over recente blootstelling (laatste 3 dagen).

5.7. Kwaliteitsbewaking

De verschillende kritische fasen die kwaliteitsbewaking vereisen zijn:

□ Pre-analytische fase

De pre-analytische fase is de fase van het onderzoek waarin het veldwerk wordt voorbereid en uitgevoerd. Concreet houdt deze fase in:

- afname van de stalen: recipiënt controle,
- labelen van de tubes,
- coderen van de stalen (identificatie);
- bewaren van de stalen;
- transport van de stalen;
- opslag van de stalen in veldwerkcoördinatiecentrum en daarna centraliseren in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.

Aandachtspunten die zullen behandeld worden in deze fase zijn:

- Expertise veldwerkers o.a. ivm bloedname.
- Ontwerp van registratiesysteem voor stalen: codeboek.
- Linking tussen de stalen en het informed consent.
- Registratie stalen in onderzoekslocatie: inschrijven staalcodes.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in veldwerkcoördinatiecentrum.
- Vervoer + inventarisatie inkomende stalen in coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen.
- Gebruik van visueel kleurcodes op tubes voor verschillende bepalingen op één bloedstaal

□ Analytische fase

In de analytische fase van het onderzoek worden de analyses op de stalen uitgevoerd. Aan de uitvoerende labo's worden kwaliteitseisen gesteld o.a. op vlak van zuiverheid recipiënten, QA certificaten en/of deelname aan ringtesten, detectielimieten, ervaring met de analyses, kwantitatieve of kwalitatieve meting.

□ Postanalytische fase

In deze laatste fase, na de analyses zal aan volgende stappen aandacht worden besteed:

- Overdracht van analysedata van de analyselabo's naar het coördinatiecentrum voor stockage & analyse van stalen: communicatie over resultaten + controle van meeteenheid.
- Archivering van deze originele datafile documenten.
- Dubbele ingave analysedata in een database.

- Kwaliteitscontroles op de ingebrachte gegevens door opvragen van beschrijvende statistiek en door alle waarden buiten het 5-95 ste percentielinterval te controleren tegen de originele documenten.

5.8. Gegevensverwerking en statistisch analyseplan biomonitoring

5.8.1. Initiële gegevensverwerking

De vragenlijstgegevens worden gecodeerd op basis van het codeboek en worden ingescand.

De meetresultaten worden overgenomen uit de elektronische datasheets die worden aangeleverd door de uitvoerende laboratoria.

5.8.2. Statistisch analyseplan

Het primaire doel van de studie is om referentiewaarden te genereren voor Vlaanderen.

De blootstellingsmerkers worden beschreven voor heel Vlaanderen. Metingen in urine worden uitgedrukt als concentratie ($\mu\text{g/L}$) en per gram creatinine. Urinestalen met een creatinine waarde $<30 \text{ mg/dL}$ of $>300 \text{ mg/dL}$ worden uitgesloten uit de analyse (Ref: WHO 1996 Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Vol. 1. Geneva, World Health Organisation).

Voor iedere biomerker van blootstelling wordt nagegaan of de gegevens normaal verdeeld zijn (boxplots, histogram, Shapiro Wilk test,...). Indien de gegevens niet normaal verdeeld zijn, wordt gezocht naar een geschikte transformatie (bij voorkeur log transformatie). Er wordt een beschrijvende statistiek gegeven voor de totale groep:

- aantal observaties;
- aantal metingen onder de detectielimiet;
- gemiddelde en standaard deviatie voor data die normaal verdeeld zijn; geometrisch gemiddelde en 95% betrouwbaarheidsinterval voor getransformeerde data;
- percentielen: p5, P10, P25, P50, P75, P90, P95.

Daarnaast worden beschrijvende statistiek gegeven per categorie van de voornaamste confounders, namelijk apart resultaten per:

- geslacht;
- leeftijd: klassen van 5 jaar;
- rookstatus: nooit gerookt, ex-roker, huidig roker;
- per categorie van cotinine (klassen nog te maken);
- BMI: ondergewicht ($\text{BMI} < 18 \text{ kg/m}^2$), normaal gewicht ($\text{BMI}: 18\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$), overgewicht ($\text{BMI}: 25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$), obesitas ($\text{BMI} > 29.9 \text{ kg/m}^2$);
- sociale klasse: categorie op basis van opleiding en/of inkomen
- woonplaats: stedelijk vs. niet-stedelijk

Voor individuele merkers kan nog een onderverdeling gemaakt worden op basis van andere confounders. Dit wordt nog gedetailleerd nagekeken in de literatuur en in de huidige populatie bestudeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een tweede doel van de studie is om associaties te bestuderen tussen blootstelling aan polluenten en gezondheidseffecten.

Voor alle bestudeerde effectmerkers wordt eerst een beschrijvende statistiek (N, gemiddelde en spreidingsmaat, percentielen) gegeven. De biomerkers van effect zijn:

- vruchtbaarheid bij vrouwen: 'time to pregnancy', vruchtbaarheidsbehandeling, miskramen;
- vruchtbaarheid en sex hormonen (inhibine B) bij de man;
- allergie en infecties: astma, hooikoorts, dierenallergie, voedselallergie, huidallergie, luchtweginfecties;
- vroegtijdige atherosclerose merkers (Hsp60, ICAM);
- bloedplaatjesfunctie.

Verklarende factoren van de biemerker van effect worden geïdentificeerd door middel van stepwise regressie analyse.

Een dosis-effect relatie geeft de samenhang tussen blootstellingmerkers (dosis) en een effectmerker (gezondheidseffect) weer. Daarnaast kunnen effectmerkers ook gerelateerd worden aan de uitwendige blootstelling, namelijk aan de acute en chronische blootstelling aan fijn stof. Om dosis-effect relaties te kwantificeren wordt gebruik gemaakt van lineaire regressiemodellen voor continue effectmerker en logistische regressiemodellen voor binaire effectmerkers. Elk model bevat steeds de confounders die reeds eerder geïdentificeerd werden voor de effectmerker.

Nota: De informatiebrochures, informed consent formulieren, vragenlijsten of het draaiboek voor de stalname van de drie campagnes zijn te bekomen op aanvraag (e-mail: greet.schoeters@vito.be of vera.nelen@pih.provant.be of elly.denhond@vito.be)

6. Communicatieplan veldwerk

6.1. Externe communicatie van de resultaten in twee fasen

De externe communicatie van de resultaten van de biomonitoringsstudie volgt steeds twee fasen.

In de eerste fase wordt **de individuele uitslag van de metingen** persoonlijk meegedeeld aan de deelnemers. Zij moeten op voorhand aangeven of ze de resultaten thuis willen ontvangen, of ze helemaal niet willen ontvangen. Resultaten die moeilijk interpreteerbaar zijn op individuele gezondheidsrisico's (bijvoorbeeld genexpressie-analyse) worden enkel op vraag van de deelnemers gecommuniceerd, steeds vergezeld van toelichting. Resultaten worden onmiddellijk meegedeeld indien ze van medisch belang zijn voor de betrokkene. Resultaten van bijkomende analyses worden enkel op vraag van de deelnemers meegedeeld.

Specifiek voor deze eerste fase is dat de externe communicatie merendeels bilateraal verloopt en slechts beperkt collectief (bv. een aankondiging dat de resultaten bekend zijn via de nieuwsbrief (zie onder)). De aandacht gaat vooral naar het beschermen van het medisch belang van de betrokken deelnemers, van zijn privacy en van zijn bevoorrechte positie bij de aankondiging van de geaggregeerde gegevens. Het meedelen van de individuele resultaten heeft geen gevolgen voor het grote publiek: er is nog geen informatie, behalve het nieuws van de externe communicatie van individuele resultaten.

Na statistische verwerking van alle individuele resultaten worden in een tweede fase de collectieve meetresultaten voor heel Vlaanderen gecommuniceerd. De deelnemers aan het onderzoek blijven de eerste externe bestemmingen van de onderzoeksresultaten. Zij krijgen de voornaamste collectieve resultaten persoonlijk toegestuurd. De Medisch Milieukundigen (MMK's) verbonden aan de LOGO's worden reeds op voorhand op de hoogte gesteld van de resultaten, zodat ze voorbereid zijn op eventuele vragen en reacties uit hun regio. Daarna worden de resultaten (elektronisch) gecommuniceerd naar een aantal intermediaire groepen, zoals provinciebesturen, waar relevant ook gemeentebesturen, lokale huisartsenkringen, moederhuizen en scholen, in nauwe samenwerking met de MMK's. Tenslotte is er de communicatie naar het grote publiek via een persbericht of persconferentie.

In het afsluitende jaar van het huidige Steunpunt Milieu en Gezondheid (2011) zal er een afzonderlijke studiedag met persconferentie worden georganiseerd waarbij de resultaten van de drie meetcampagnes (alsook van eventuele bijkomende metingen in de biobank) binnen de gehele onderzoeksperiode (2007-2011) gecommuniceerd worden.

Tevens zal op het einde van dit Steunpunt duidelijk gemaakt worden hoe het beheer van de biobank naar de toekomst georganiseerd zal worden. Er zal worden meegedeeld wat de stand van zaken is op dat moment, nl. welke metingen tot dan gebeurd zijn. Er wordt de mogelijkheid geboden om individuele resultaten op te vragen. Er wordt vermeld wat er in de toekomst met de biobank zal gebeuren, en er wordt een contactadres gegeven voor het opvragen van informatie of stopzetten van de deelneming.

Ook zal worden aangegeven op welke wijze gecommuniceerd zal worden over onderzoeksactiviteiten die doorlopen na afsluiting van het huidige Steunpunt, zoals bijvoorbeeld een eventuele neurologische opvolgstudie.

6.2. Spelregels

Een document 'Spelregels Risicocommunicatie' werd opgesteld door de sociale wetenschappers van het Steunpunt en goedgekeurd door de Stuurgroep. In dit document wordt een aantal uitgangspunten, kwaliteitseisen en aandachtspunten voor communicatie beschreven die als toets gelden bij elke belangrijke ontwikkeling of keuze in de voortgang van de onderzoeksprojecten. Dit document is ook van toepassing op de biomonitoring beschreven in dit draaiboek.

6.3. De Biomonitor en de Nieuwsflits

Tussentijdse communicatie en samenvattingen van resultaten worden opgenomen in de 'Biomonitor' (elektronische nieuwsbrief) en/of de 'Nieuwsflits' (persbericht) die beide verschijnen op de website van het Steunpunt. Na afronding van de studie worden de volledige resultatenrapporten, alsook achtergronddocumenten en analyseplannen op de website van het Steunpunt geplaatst.

De Biomonitor is een gemeenschappelijk initiatief van vier verschillende actoren: het Steunpunt Milieu en Gezondheid, het departement Leefmilieu, Natuur en Energie van de Vlaamse Overheid, het departement Toezicht Volksgezondheid van het Vlaams Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Gezin en de Medisch Milieukundigen. Samen maken zij deel uit van het Vlaams Medisch Milieukundig Netwerk. Bedoeling van de nieuwsbrief is zo breed mogelijk verschillende doelgroepen in Vlaanderen te informeren over het Steunpunt Milieu en Gezondheid. Deelnemers aan de biomonitoringsstudie kunnen bij aanvang van het onderzoek inschrijven op deze nieuwsbrief om op de hoogte te blijven van de activiteiten van het Steunpunt en van collectieve resultaten van eventuele bijkomende analyses.

6.4. Fasenplan

Voor de vertaling van de biomonitoringsresultaten richting beleid werd door de het Steunpunt in samenwerking met de Vlaamse overheid een gefaseerde procedure uitgewerkt, het fasenplan. In verschillende fasen wordt achtereenvolgens ingezoomd op de ernst met betrekking tot de volksgezondheid van bepaalde meetresultaten, de mogelijke oorzaken van vastgestelde afwijkingen en de aanpak van mogelijke milieubronnen. Tussentijdse communicatie over dit fasenplan naar het brede publiek gebeurt (steeds na overleg met de overheid) via de website van het Steunpunt. Actoren die direct betrokken zijn bij onderdelen van het fasenplan (experten, maatschappelijke groepen, participanten in aanvullend onderzoek) zullen individueel op de hoogte gesteld worden van ontwikkelingen in het kader van het fasenplan.